

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.med. H.-J. Merker

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
FIBRILLOGENESE IN DER GINGIVA EMBRYONALER MÄUSE

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

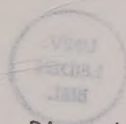
Zahnarzt Tilo Hörstmann
aus Celle

1977

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.med. H.-J. Merker

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
FIBRILLOGENESE IN DER GINGIVA EMBRYONALER MÄUSE



Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Tilo Hörstmann

aus Celle

Referent: Professor Dr. med. H.-J. Merker

Korreferent: Professor Dr. Hans Lenz



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. November 1977

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	Seite 1 - 10
2. Material und Methoden	Seite 11- 12
3. Befunde	Seite 13- 21
4. Diskussion	Seite 22- 32
5. Zusammenfassung	Seite 33- 34
6. Literaturverzeichnis	Seite 35- 49

Bildanhang

Lebenslauf

1. Einleitung

Die mechanische Widerstandskraft der Gewebe beruht in der Hauptsache auf der Qualität und Quantität der bindegewebigen Interzellulärschubstanz. Auf Druck belastete Stütz- und Bindegewebe, als klassisches Beispiel sei der Knorpel genannt, sind durch große Mengen dieser zwischenzelligen Substanz charakterisiert, die sich durch einen großen Gehalt sowohl an Kollagen als auch an Proteoglykanen auszeichnen. Das Kollagen liegt in Form von Fibrillen vor, deren morphologisches Verhalten in Abhängigkeit von der Zelle wechselt. In Zellnähe finden sich dünne Fibrillen, die einzeln und unregelmäßig verlaufen; entfernt von den Zellen liegen dicke Fibrillen, die gebündelt vorliegen. Diese Fadenstrukturen sind für das Auffangen der Zug- und Scherkräfte verantwortlich, die bei der Druckbelastung entstehen. Die eigentliche Druckbelastung wird durch die Fähigkeit der Proteoglykane, große Mengen Wasser zu binden, abgefangen. Dadurch entsteht ein sogenanntes Turgorgewebe, das den einwirkenden Kräften einen prall elastischen Widerstand entgegensetzt und sie an die kollagenen Strukturen weiterleitet (MERKER, 1977; GOEL and JACOB, 1976; LANE and WEISS, 1975; MAROUDAS, 1975, 1976; ARNOLD and HARTUNG, 1974).

Allein auf Zugbelastung konstruierte Gewebe, wie z.B. die Sehnen und Fascien, bestehen vorwiegend aus dicken kollagenen Fibrillen, die parallel zur einwirkenden Kraft gebündelt verlaufen. Die Menge

der Proteoglykane ist vergleichsweise gering (PARRY and CRAIG, 1977; SCHWARZ, 1958, 1960, 1961, 1977). Das interstitielle Bindegewebe, das Organstroma, nimmt eine Zwischenstellung ein. Es enthält locker gepackte, unregelmäßig verlaufende Bündel aus relativ dünnen Fibrillen, die in eine proteoglykanreiche Grundsubstanz eingebettet sind, Dadurch kann diese Bindegewebsform den verschiedenen mechanischen Beanspruchungen gerecht werden: Zug, Druck und Volumenänderungen (MERKER, 1974; SCHWARZ et al., 1958, 1977).

Der bindegewebige Anteil der Gingiva von Mensch und Tier ist ebenfalls ein mechanisch sehr belastetes Gewebe, das während der Funktion Zug-, Druck- und Scherkräften ausgesetzt ist. Es finden sich deshalb hier große Mengen Interzellulärsubstanz, zusammengesetzt aus Kollagen und Proteoglykanen .

Bei der Untersuchung und funktionellen Deutung des Bindegewebes hat deshalb die Synthese, Sekretion und das weitere Schicksal der Interzellulärsubstanz - die Reifung - eine wesentliche Bedeutung. Diese Vorgänge sind in einer Reihe von embryonalen Geweben, in den Zellkulturen und bei der Wundheilung biochemisch und morphologisch untersucht worden. Es bestehen deshalb gesicherte Kenntnisse über zahlreiche Abschnitte der Entstehung der Interzellulärsubstanz.

Zunächst muß davon ausgegangen werden, daß die beiden Hauptbestandteile der Interzellulärsubstanz, das Kollagen und die Proteoglykane, von ortsständigen Zellen synthetisiert und sezerniert werden. Bislang war die Mesenchymzelle in Form des Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten für diese Funktion verantwortlich gemacht worden. In jüngster Zeit häufen sich aber die Befunde, die auf eine Kollagen- und Proteoglykane-synthese auch in anderen Zelltypen hinweisen. So konnte eine Synthese zum Beispiel von Kollagen im Cornea-Epithel, im Chondraepithel, im Neuroepithel und in anderen Epithelverbänden sowie in glatter Muskulatur verschiedener Lokalisationen nachgewiesen werden (ROHR and JUROKOVA, 1968; TRELSTAD, 1971; HAY and MEIER, 1974; CARLSON et al., 1974). Nach autoradiographischen, biochemischen und morphologischen Befunden kann jedoch angenommen werden, daß große Teile der Interzellulärsubstanz von den ortsständigen Bindegewebszellen, beim Embryo von den mesenchymalen Vorstufen, gebildet werden (AMPRINO, 1955, 1956; FERNANDO and MOVAT, 1963; HARDINGHAM et al., 1972; KOSURG, 1961; LEVENE and BATES, 1975; LINDNER, 1963; MANCINI et al., 1961; MERKER, 1961 a,b; MERKER and STRUWE, 1972; PROCKOP, 1969; ORLOWSKI, 1976; ROSS, 1974, 1975; SCHINDLER et al., 1976).

Die funktionsmäßig wichtigsten Bestandteile dieser Interzellulärsubstanz sind das Kollagen und die Proteoglykane. Das Kollagen stellt ein Skleroprotein dar, das sich durch eine charakteristische

Aminosäuresequenz, z.B. Gehalt von Hydroxyprolin und Glyzin auszeichnet (KÜHN and FITZEK, 1975; RICH and CRICK, 1955). Analog anderen protein-synthetisierenden und -sezernierenden Zellen werden die kollagenen Polypeptidketten an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums gebildet (FERNANDEZ-MADRID, 1970; GOULD, 1968; GRANT and PROCKOP, 1972; HARWOOD et al., 1975; MILLER and MATUKAS, 1974; KIVI-RIKKO and RISTELLI, 1976; WEINSTOCK and LEBLOND, 1974). Von hier gelangen sie durch die begrenzende Membran in die endoplasmatischen Hohlräume hinein. Über den endgültigen Ausschleusungsmechanismus besteht noch keine völlige Klarheit. Das Fehlen von Sekretgranula in den synthetisierenden Zellen und das schnelle Ausschleusen von markiertem Kollagen haben eine direkte Öffnung der endoplasmatischen Hohlräume nach außen vermuten lassen (REVEL and MAY, 1963; ROHR, 1965; ROSS and BENDITT, 1965; weitere Literatur MERKER, 1974).

Neuere biochemische Untersuchungen lassen aber eine andere Vorstellung wahrscheinlicher werden, die dem Sekretionsmodus in anderen Drüsenzellen entspricht: Über einen Vesikelfluß gelangt das Syntheseprodukt Kollagen in den Golgi-Apparat. Hier wird es zur endgültigen Sekretion verarbeitet, in Granulaform abgepackt und in Richtung Zellmembran transportiert. Durch Verschmelzen der Granulamembran mit der Zellmembran und Auf-

reißen dieses Bezirks gelangt schließlich der Granulainhalt, das Kollagen, nach außen, ohne daß die Kontinuität der Membran unterbrochen wird (EHRlich and BORNSTEIN, 1972; EHRlich et al., 1974; SCHERFT and HEERSche, 1975; MARWOOD et al., 1976; KRUSE and BORNSTEIN, 1975).

Möglicherweise noch innerhalb der Zelle, zum großen Teil aber extrazellulär, spielen sich dann Aggregationsvorgänge ab, die aus morphologischer Sicht interessant sind, da sie sich elektronenmikroskopisch erfassen und damit beurteilen lassen.

Als ersten Schritt in dieser Kette muß die Verknüpfung von drei Polypeptidketten in Form einer α -Helix betrachtet werden. Dabei spielen die gestreckten, endständigen Peptide eine wichtige Rolle. Das entstehende Makromolekül, das sogenannte Prokollagen verändert sich durch Abspalten der linearen Endabschnitte zum Tropokollagen = TC-Molekül. Diese Strukturen können als eigentlicher Baustein aller höheren Aggregationsformen betrachtet werden. Durch eine jeweils um $1/4$ verschobene seitliche Aggregation entsteht ein hochgeordnetes Muster mit periodischen Wiederholungen - das sogenannte periodische Querstreifungsmuster des Kollagens (GROSS, 1956; KÜHN et al., 1960; MÜLLER and KÜHN, 1977; SCHMITT, 1959; STEVEN, 1974; MERKER, 1974).

Diese Vorgänge führen zu elektronenmikroskopisch bereits gut sichtbaren Filamenten, die bis zu 150 Å dick sind und noch keine Querstreifung zeigen. Durch weitere seitliche Aggregation verschieben sich die Filamente. Die geordnete Überlappung der TC-Moleküle läßt die Querstreifung immer klarer hervortreten, und es entsteht die typische quergestreifte Kollagenfibrille (GROSS, 1956; KÜHN et al., 1960; MÜLLER and KÜHN, 1977; SCHMITT, 1959; STEVEN, 1974).

Interessant ist die Beobachtung, daß die Fibrillen entsprechend der Tierart, der Lokalisation, des Alters und an der Belastung eine typisch durchschnittliche Dicke aufweisen. Nach Erreichen dieses Wertes ist die Reifung des Mesenchyms bzw. Bindegewebes jedoch noch nicht abgeschlossen. Es folgt die Bündelung der Einzelfibrillen zu einer Faser (Faserbildung) und die Entwicklung einer charakteristischen Stellung der Fasern im Raum, die sogenannte Texturbildung (MERKER, 1974; SCHWARZ, 1958, 1960, 1961; SCHWARZ et al., 1958).

Trotz der schnellen Erforschung dieses Gebietes in den letzten Jahren existieren noch zahlreiche Kenntnislücken. An dieser Stelle sei besonders auf das Problem des Sekretionsmodus, der Ursachen der geordneten Aggregation des Kollagens, der Faserbildung (Bündelung) und vor allem der Texturbildung hingewiesen. Bisher sind die kausalen Faktoren und die primär wirksamen Kräfte, die diese Vorgänge er-

/

möglichen und prägen noch umstritten oder nur als Hypothesen formuliert (siehe auch WEISS, 1929).

Bei der Diskussion der Fibrillenbildung muß die Tatsache der strengen Ordnung beim Aggregationsvorgang berücksichtigt werden. Diese Ordnung könnte einmal durch Faktoren erfolgen, die im Kollagenmolekül selbst liegen, z.B. reaktive Seitengruppen. Ein derartiges Einschnappen an richtiger Stelle kann jedoch erst dann erfolgen, wenn die Bausteine in richtiger Position gelagert sind. Das Heranführen der kollagenen Makromoleküle könnte einmal zufällig erfolgen oder aber durch Hilfsmechanismen vermittelt werden. Die Zufälligkeit ist bei der Schnelligkeit und dem Ausmaß der ablaufenden Vorgänge nur schlecht vorstellbar. Biochemische Untersuchungen und Befunde der jüngsten Zeit machen dagegen eine Beteiligung der Proteoglykane wahrscheinlich. Die Sulfatgruppen auf den Disacharidketten der Glucosaminoglykane binden sich sehr schnell an Tropokollagenmoleküle und verursachen dadurch in vitro eine Fällung bzw. eine Aggregation des Kollagens. Die Proteoglykane könnten also das Einfangen, die Ausrichtung und das Zusammenführen des TC-Moleküls vermitteln (MERKER et al., 1977; NEMETH-CSOKA, 1970; MERKER and GÜNTHER, 1972; TOOLE and LOWTHER, 1968; TOOLE, 1976). Wenn diese, inzwischen durch verschiedene gut abgesicherte Untersuchungen, wahrscheinliche Vorstellung zutrifft, müßten die Proteoglykane darüberhinaus auch noch einen Einfluß auf die

Ausrichtung und den Verlauf der entstehenden Fibrillen haben. Allerdings existieren für diese Hypothesen bisher noch keine gesicherten morphologischen Grundlagen.

Eine Mitwirkung der Proteoglykane bei der Textur-entstehung kann allerdings daraus nicht direkt abgeleitet werden. Bei Darstellung dieser Prozesse im Elektronenmikroskop findet sich häufig noch eine sekundäre Umlagerung der Einzelfibrillen oder kleinen Fibrillenbündeln in andere, dann endgültigen, Verlaufsrichtungen. Als wirksame Kraft müssen mechanische Kräfte wie Druck und Zug verwendet werden.

Im Experiment ordnen sich die Fibrillenbündel entsprechend den trajektoriellen Kraftlinien an (WEISS, 1929). Unklar sind aber noch die Mechanismen, die diese Einflüsse dann an Ort und Stelle realisieren. Bisher sind hier die richtenden Wirkungen der Zellen, besonders ihrer Außenmembranen, diskutiert worden (MERKER, 1961, 1974; SCHWARZ, 1964). Zweifellos bestehen enge räumliche Beziehungen zwischen den sich neu bildenden Fibrillen und der Zellmembran. In Bezirken mit hoher Ordnung der Textur, z.B. in der Cornea, kommen aber zu wenig Zellen vor, die diese Aufgaben erfüllen könnten. Andere Faktoren müssen deshalb vermutet werden. Auch hier wieder werden neuerdings die Proteoglykane diskutiert. Ihr dreidimensionales Netzwerk muß durch physikalische Kräfte verformt werden. Damit würde über den vorher besprochenen Mechanismus eine Änderung der Textur möglich sein (HACKELBERG, 1971; MERKER, 1974, 1975; TAUBE, 1976; SCHWARZ, 1964).

Die Gingiva mit ihrem straffen Bindegewebe ist zum Auffangen verschiedener mechanischer Kräfte konstruiert. Hier wirken, häufig gleichzeitig, Druck-, Zug- und Scherkräfte ein. Das den Zähnen direkt benachbarte Bindegewebe übt darüberhinaus noch Spezialfunktionen zur Stabilisierung der Zähne aus. Dieser Teil des Zahnhalteapparates soll bei den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt werden. Das übrige gingivale Bindegewebe weist entsprechend der vielfältigen mechanischen Einwirkungen eine dichtgepackte dreidimensionale Textur aus unregelmäßig verlaufenden und miteinander verflochteten Fasern auf. Sie stellt deshalb ein gutes Modell zum Studium der Fibrillogenesevorgänge und der Texturbildung dar.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb diese Vorgänge mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Technik untersucht und zu einigen noch umstrittenen Fragen Stellung genommen werden.

Hier sind zu erwähnen der Sekretionsmodus der Fibroblasten, die Beziehungen zwischen Proteoglykan und Kollagenbausteinen am Beginn der Fibrillogenese sowie schließlich die Bündel- und Texturbildung. Darüberhinaus fehlen noch beschreibende Untersuchungen bei den häufig verwendeten Laboratoriumstieren Ratte und Maus auf diesem Gebiet. Diese Kenntnisse sind aber not-

wendig, um den Einfluß teratogener und embryotoxischer Substanzen im Mundbereich genauer erfassen und deuten zu können.

2. Material und Methoden

Mäuse-Embryonen des Stammes NMRI wurden an den Tagen 12 bis 19 in Äthernarkose entnommen und sofort in die Fixierungslösung eingelegt. Sie bestand entweder aus einer Mischung von 3 % Paraformaldehyd und 3 % Glutaraldehyd in 0.2 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) oder aus dieser Lösung mit einem Zusatz von 2 ‰ Rutheniumrot. In der Fixierungslösung erfolgte die Entnahme des Unterkiefers durch Parallelschnitte, die durch den Mund und unterhalb des Unterkiefers durch den Hals geführt wurden. Nach mehrstündiger Fixierung, Waschen in der Cacodylat-Pufferlösung mit oder ohne Rutheniumrotzusatz schloß sich die Nachfixierung in 1 %igem OsO_4 (Cacodylatpuffer, 0.2 M, pH 7,2) mit oder ohne Rutheniumrotzusatz für 2 Stunden an. Nach Entwässerung in der Acetonreihe erfolgte die Einbettung in Mikropal (Fa. FERAK, Berlin). Dabei wurden die Unterkieferscheiben flach in größeren Mikropalblöcken orientiert, so daß ein gerichtetes Anspitzen möglich wurde.

Schnitttherstellung: LKB-Ultratome

Aufnahmen: SIEMENS Elmiskop 101 und ZEISS EM 10

Kontrastierung: Uranylacetat und Bleicitrat mit
einer Primärvergrößerung von
1000 - 30 000.

Zur besseren Orientierung im Block und zur Auswahl geeigneter Stellen stellten wir vor Her-

stellung der Dünnschnitte Semidickschnitte ($1/2 - 1 \mu$) her, die nach Anfärbung mit alkalischer Giemsa-Lösung bei 60° für 1 Minute eine lichtmikroskopische Beurteilung erlauben.

Die Messungen wurden mit einem ZEISS-Meßokular an 3 1/2-fachen Papiervergrößerungen der Originalbilder durchgeführt.

3. Befunde

Zum besseren Verständnis der im folgenden beschriebenen Befunde soll eine kurze Darstellung der Entstehung des Unterkiefers und dessen Zahnanlagen in dem hier benutzten Mäusestamm (NMRI) gegeben werden.

Am späten Tag 13 läßt sich erstmalig der Meckel'sche Knorpel darstellen. Die wulstige Begrenzung der primären Mundhöhle nach außen ist noch nicht in Lippe und proc. alveolaris gegliedert, das Epithel ist noch unauffällig und undifferenziert. Im Verlauf des Tages 14, häufig jedoch erst am frühen Tag 15, treten die ersten Zeichen einer desmalen Osteogenese im Unterkieferbereich lateral vom Meckel'schen Knorpel auf. Am Tag 14 erfolgt auch die Trennung zwischen Lippenanlage und proc. alveolaris durch das leistenartige Eindringen von Epithelgewebe zwischen beide Bezirke. Erste Zahnanlagen in Form von zapfenartigen epithelialen Proliferationen in das Mesenchym hinein lassen sich am Tag 15 nachweisen. Einen Tag später hat die knöcherne Anlage des Unterkiefers bereits rostrale Bereiche erreicht. Die proc. angularis und condylaris sind noch nicht ausgeprägt. Sie erscheinen als knorplige Vorstufe am Tag 16. An diesen Tagen lassen sich auch lichtmikroskopisch die ersten feinen Bindegewebssäferchen im Bereich der Gingiva-Anlage erkennen. Sie nehmen in den folgenden Tagen an Zahl und Dicke zu. Am Tag 17 haben die Zahn-

lagen die Phase der Glockenform erreicht. In den Incisivusanlagen beginnt zu diesem Zeitpunkt die Synthese der organischen Matrix. Die Mineralisation erfolgt ab Tag 18.

Im elektronenmikroskopischen Bild geht die Entwicklung des gingivalen Bindegewebes von einem typischen embryonalen Mesenchym aus, das die Unterkieferanlage relativ gleichmäßig ausfüllt. Dieses Gewebe ist charakterisiert durch locker gepackte Zellen, die unterschiedlich weite Interzellularräume zwischen sich fassen. Die Zellen weisen eine sehr variable Form auf: Zwischen plump-ovalen oder polygonalen Zellen bis hin zu sternförmigen Zellen lassen sich alle Übergänge nachweisen. Die Oberfläche ist sehr unregelmäßig gestaltet. Es kommen zahlreiche unterschiedlich lange und breite Fortsätze vor, denen wiederum kleinere Fortsatzformen aufsitzen können. Sie erstrecken sich teilweise weit in die Umgebung und können sich mit entsprechenden Fortsätzen der Nachbarzellen berühren. An den Kontaktstellen bleibt meistens ein Interzellularraum von 50 - 200 Å nachweisbar, nur selten einmal geht er verloren und die äußeren Lamellen der Zellmembran verschmelzen.

Im Cytoplasma überwiegen freie Ribosomen, die zu meist gruppiert in Form von Polysomen vorkommen. Die Zahl der übrigen Zellorganellen bzw. ihre Größe ist sehr gering: Schmale Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien vom Cristae-

Typ, Golgi-Apparat und vesikuläre Strukturen. Der Kern ist groß und rund und weist ein aufgelockertes Caryoplasma auf. Nur in den Bereichen des Randchromatins und des Nucleolus heben sich Verdichtungen hervor.

Der interzelluläre Raum erscheint nach Anwendung der üblichen Präparationsmethoden optisch weitgehend leer. Mit der Rutheniumrot-Methode und bei höheren Vergrößerungen lassen sich jedoch einige Strukturen im Interzellularraum erfassen. Es handelt sich einmal um runde bis zipfelig ausgezogene Granula, die eine Größe von 400 - 700 Å aufweisen. Von ihnen aus strahlen dickere (100 - 150 Å), sich allmählich verjüngende oder feine (40 - 50 Å) Filamente aus, die sich auch verzweigen können. In der Peripherie berühren sich die Filamente benachbarter Granula. Die zentralen Granula liegen häufig 3 000 - 5 000 Å voneinander entfernt, jedoch kann dieser Wert stark variieren.

In Analogie zu Befunden an anderen Organen handelt es sich bei diesen Strukturen um Hyaluronsäure und Proteoglykane des mesenchymalen Interzellularraumes. Daneben kommen noch ganz vereinzelt etwa 150 Å gleichmäßig dicke Filamente vor, die vorwiegend einzeln, höchstens in kleinen Bündeln zu drei bis fünf regellos verlaufen. Sie müssen als erste Kollagenstrukturen gedeutet werden. Nach Anwendung der Rutheniumrot-Methode sitzen ihnen häufig die oben beschriebenen elektronendichten Granula auf.

Diese Beschreibung gilt für die frühen Stadien der Tage 12 und 13. Durch die Abgliederung der eigentlichen Unterkieferanlage vom Lippenbereich und die Entwicklung des Unterkieferknochens in den tieferen Zonen kommt es zu einer Dichterstellung der Zellen im Gebiet der prospektiven Gingiva. Dazu kommt noch eine ausgeprägte Verdichtung des Mesenchyms um die Zahnanlage herum. In den Interzellularräumen dieser Mesenchymverdichtungen lassen sich nur vereinzelt Rutheniumrot-positive Granula mit ausstrahlenden Filamenten und dünne kollagene Strukturen darstellen. In der folgenden Beschreibung sollen die mesenchymalen Bereiche der eigentlichen Zahnanlage nicht mehr berücksichtigt werden. In den gingivalen Zonen zwischen den Zahnanlagen hat sich durch die Dichterstellung der Zellen ihre Form etwas verändert, die Zahl und Länge der Fortsätze hat sich verringert, dadurch wird die Gestalt plumper, die Feinstruktur des Cytoplasmas jedoch entspricht weitgehend den Beschreibungen von Tag 12 und 13.

Auch im Interzellularraum finden sich ohne große Veränderungen die Rutheniumrot-positiven Granula mit ausstrahlenden Filamenten und einzelne Kollagenstrukturen.

Ab Tag 15 beginnt eine morphologisch gut faßbare Entwicklung. Sie ist gekennzeichnet durch die Differenzierung der Mesenchymzellen und die Zu-

nahme und Reifung der elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen im Interzellularraum.

Die Mesenchymzellen behalten ihre variable Gestalt bei, jedoch nimmt die Zahl und Länge der Fortsätze ab. Dadurch verringert sich auch die Anzahl der Zellkontakte. Im Cytoplasma liegen immer noch große Mengen von Polysomen. Die Zahl und Größe der Hohlräume des rauhen ER nimmt aber deutlich zu. Häufig findet man jetzt Zellen, deren endoplasmatische Hohlräume cisternen-artig gebläht sind. Auch die Mitochondrien nehmen etwas an Zahl und Größe zu. Der Golgi-Apparat dehnt sich aus, und es treten vermehrt vesikuläre Strukturen und auch membranbegrenzte Vakuolen und elektronendichte Granula ($1\ 000 - 3\ 000\ \text{\AA}$) auf. Vereinzelt finden sich solche Granula auch unter der Zellmembran. Die Größe des Nucleolus hat deutlich zugenommen.

Diese Zellen müssen wegen ihres stark entwickelten rauhen ER und des großen Golgi-Apparates als Fibroblasten bezeichnet werden.

Die mit der Differenzierung verbundene Funktion dieses Zelltyps läßt sich im ultrastrukturellen Bild des Interzellularraumes ablesen. Hier treten jetzt zunehmend elektronenmikroskopisch faßbare Strukturen auf. Sie können nach bisher vorliegenden Befunden als Kollagen bzw. Proteoglykane identifiziert werden. Von dem bereits beschriebenen morphologischen Substrat dieser Substanzen, mit etwa 150 Å dicken kollagenen Filamenten und Rutheniumrot-positiven Granula, führt in den folgenden Tagen die Entwicklung zu dichtgepackten Bündeln aus kollagenen Fibrillen und den entsprechenden verteilten Proteoglykanstrukturen.

Diese Entwicklung beginnt mit einer Vermehrung der kollagenen Filamente, die sowohl einzeln als auch gebündelt auftreten. Es lassen sich jetzt Bündel nachweisen, die bis zu 10 Einzelfilamente enthalten. Gleichzeitig mit dieser Vermehrung läuft ein Dickenwachstum ab. Überschreitet die kollagene Fadenstruktur eine Dicke von 200 Å, so tritt eine Querstreifung auf, die sich in Abhängigkeit von der Dicke der Fibrillen immer deutlicher ausprägt. Sowohl Einzelfibrillen als auch die gebündelten Fibrillen haben am Tag 16 Dicken von 250 Å erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Zunahme der Bündelungsvorgänge zu erfassen. Es treten immer mehr, in engem Abstand parallel verlaufende, Fibrillen auf, die sich deutlich von der fibrillenfreien Umgebung absetzen.

Diese Bündel können jetzt bereits (Tag 16) bis zu 20 Einzelfibrillen enthalten.

Eine Vorzugsrichtung der Einzelfibrillen oder aber der Fibrillenbündel ist noch nicht genau zu erkennen. Die Fibrillenbündel sind aber in unterschiedlichen Winkeln angeschnitten, so daß sich ein dreidimensionales Bündelgefüge ergibt.

In diesem Stadium der starken Vermehrung kollagener Strukturen sind die Beziehungen zwischen Rutheniumrot-positiven Granula und kollagenen Fibrillen bzw. Filamenten am deutlichsten sichtbar zu machen. Nach Anwendung der Rutheniumrot-Methode lassen sich eine Fülle der bereits früher beschriebenen elektronendichten Granula im Elektronenmikroskop erkennen. Sie sind etwa $400 - 700 \text{ \AA}$ groß, häufig angedeutet zipflig ausgezogen. Von diesen Zipfeln aber auch von den abgerundeten Bereichen strahlen feine Filamente, die meistens nicht dicker sind als $50 \text{ \AA}$, in die Umgebung aus. Filamente von benachbart liegenden Granula können sich berühren. Versucht man aus dem zweidimensionalen Schnitt ein dreidimensionales Bild zu entwickeln, so ergibt sich ein Netzwerk feiner Filamente, in deren Kreuzungspunkten die beschriebenen Granula lokalisiert sind.

Der Abstand der granulären Zentralstrukturen variiert zwischen $3\,000$ und $5\,000 \text{ \AA}$. Feine Filamente können auch bis an die kollagenen Filamente bzw.

Fibrillen heranreichen. Auffällig ist aber die direkte räumliche Beziehung zwischen Rutheniumrot-positiven Granula und kollagenen Strukturen. Solche Granula sitzen vereinzelt den Filamenten, besonders aber den Fibrillen in regelmäßigen Abständen direkt auf. Beim Ausmessen dieser Abstände ergibt sich, daß die Werte - gemessen von Mittelpunkt zu Mittelpunkt - nur wenig um 700 - 800 Å schwanken.

An den folgenden Tagen nimmt die Menge der Strukturen der Interzellulärsubstanz im gingivalen Bereich immer mehr zu. An dieser Mengenzunahme sind sowohl die Einzel- als auch die gebündelten Fibrillen beteiligt. Gleichzeitig vermehrt sich die Zahl der Fibrillen pro Bündel ebenfalls. Es lassen sich in zunehmender Menge Bündel mit 20 - 30 Einzelfibrillen darstellen. Ihre Verlaufsrichtung ist in den Dünnschnitten nur schwierig zu beurteilen. Die Rekonstruktion eines dreidimensionalen Bildes spricht für eine Durchflechtung von Bündeln. Es lassen sich Verlaufsrichtungen parallel, senkrecht und schräg zur gingivalen Oberfläche beobachten. Der interfibrilläre Raum bleibt weiterhin ausgefüllt mit dem lockeren Netzwerk der Rutheniumrot-positiven Granula und ihren Filamenten.

Betrachtet man während dieser Vorgänge die räumliche Beziehung zwischen Zellen und kollagenen Strukturen, so ergibt sich ein wechselndes und schwierig zu be-

urteilendes Bild. Zum überwiegenden Teil sind Filamente, Einzelfibrillen oder Fibrillenbündel in einiger Entfernung von der Zellmembran lokalisiert. Daneben kommen aber vereinzelt direkte Anlagerungen vor. In diesem Fall besteht aber keine deutliche Beziehung zwischen der Verlaufsrichtung von Zellfortsätzen bzw. Vorzugsachsen von Zellen und Verlaufsrichtung der kollagenen Strukturen.

Am Ende der Schwangerschaft (Tag 19) hat sich das Verhältnis von der Interzellulärsubstanz zu den Zellen noch weiter zugunsten letzterer verschoben. In den Interzellulärräumen dominieren jetzt die kollagenen Strukturen, d.h. die interfibrillären Räume haben relativ abgenommen. Wenn auch Einzelfibrillen und Filamente noch nachweisbar sind, so überwiegen jetzt doch Fibrillenbündel, deren Größe sehr variabel ist. Es kommen sowohl Bündel vor mit nur 3 - 5 Fibrillen als auch solche, die bis zu 40 Fibrillen enthalten. Der unregelmäßige Verlauf dieser Bündel und ihre verflochtene Anordnung kommt jetzt im elektronenmikroskopischen Bild deutlich zur Darstellung.

4. Diskussion

Die von uns im bindegewebigen Anteil der Gingiva von Ratten untersuchte Synthese, Sekretion und Reifung der beiden Hauptstrukturen des Interzellularraumes - Kollagen und Proteoglykane - entspricht nach den bisher vorliegenden Befunden den entsprechenden Vorgängen in anderen Regionen des Organismus. Das elektronenmikroskopische Bild dieser Prozesse ist - wie in der Einleitung ausführlich referiert - in wesentlichen Teilen sehr gut bekannt. Noch umstritten war nach Auswertung der Literatur:

1. der intrazelluläre Transportweg und der Sekretionsmechanismus des Kollagens,
2. die Beteiligung der Proteoglykane an der Aggregation der kollagenen Vorstufen zu höheren Einheiten (Filamente, Fibrillen), d.h. der genaue Nachweis einer räumlichen Beziehung zwischen Kollagen und PG
3. die Faktoren und Ursachen, die die Bündelung und Ausrichtung der Fibrillenbündel, der Fasern bewirken, d.h. die Texturentstehung. Sie prägt die funktionelle Belastbarkeit des jeweiligen Bindegewebes.

Ad 1.: Die Synthese des Kollagen-Polypeptids, die posttranslationen Veränderungen (z.B. Hydroxylierung) und der Aufbau der prokollagenen Tripelhelix erfolgt an den Ribosomen

des rauen endoplasmatischen Retikulums bzw. in den endoplasmatischen Hohlräumen. Der Ausschleusungsmechanismus war lange Zeit umstritten. Das Fehlen von typischen Sekretgranula und der sehr schnelle Abstrom von ^3H -Prolin, eine typische Aminosäure des Kollagens, vom ER in den extrazellulären Raum schien eine direkte Öffnung der endoplasmatischen Hohlräume nach außen anzuzeigen.

Untersuchungen mit Colchizin, das die Sekretion des Kollagens hemmt, ergaben aber ein vermehrtes Auftreten von elektronendichten Sekretgranula (JANSEN and BORNSTEIN, 1974; ROJKIND and KERSHENOBICH, 1975; KUDO, 1975; EHRLICH and BORNSTEIN, 1972; EHRLICH et al., 1974; SCHERFT and HFERSCHKE, 1975). Genauere biochemische Untersuchungen in kürzeren Zeitabständen ergaben darüberhinaus eine Markierung durch ^3H -Prolin auch einer Vesikel- und Golgi-Fraktion. Bereits nach 20 Minuten sind markierte kollagene Vorstufen im extrazellulären Raum nachweisbar (HARWOOD et al., 1976). Diese Befunde lassen folgende Vorstellung entwickeln: Aus den endoplasmatischen Hohlräumen wird das Syntheseprodukt in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, also über einen vesikulären Abschnürungsprozess, einen Vesikelfluß und eine Verschmelzung mit den Golgi-Hohlräumen. Hier erfolgt dann das Abpacken und eine schnelle und sofortige Sekretion. Die

Sekretion erfolgt so zügig, daß die Zahl der erfaßbaren Sekretgranula sehr gering sein muß. Damit lassen sich zwei sekretorisch aktive Zelltypen unterscheiden: Einmal typische Drüsenzellen, die ihr Sekretprodukt speichern und nur auf einen bestimmten Reiz hin die Sekretgranula entleeren. Dann ein Zelltyp (Fibroblast, Chondroblast, Osteoblast), der in kürzester Zeit offenbar ohne Notwendigkeit eines besonderen Reizes die synthetisierten Substanzen ausschleust (TRELSTAD, 1971; WEINSTOCK and LEBLOND, 1974; WEINSTOCK, 1972; HARWOOD et al., 1976).

Auf der Basis dieser Kenntnisse müssen die vereinzelt in den Fibroblasten der Gingiva-Anlage elektronenmikroskopisch nachweisbaren dichten und membranbegrenzten Strukturen als die Sekretgranula angesehen werden, die sich gerade auf dem Wege vom Golgi-Apparat zur Zellmembran befinden. Damit entsprechen die Fibroblasten der Gingiva wie die mesenchymalen Zellen anderer Regionen des Embryos in ihrem sekretorischen Mechanismus den anderen Drüsenzellen, jedoch nicht in ihrem zeitlichen Verhalten.

Die Erfassung des Sekretionsweges der Proteoglykane erwies sich von Anfang an als weniger problematisch. Ihr Proteinanteil wird ebenfalls an den Ribosomen des rauhen ER gebildet. Hier wachsen wahrscheinlich auch schon die Disaccharidketten an diesem zentralen Peptidstück auf.

Nach dem Transport zum Golgi-Apparat erfolgt hier die Sulfatierung des Moleküls. Die Sekretion geht dann mit dem Kollagen gemeinsam - wie beim Kollagen beschrieben - sehr schnell vor sich. Es kann deshalb angenommen werden, daß sich Kollagen und Proteoglykane bereits in den Sekretgranula räumlich sehr nahe kommen. Ob hier allerdings schon eine Verknüpfung erfolgt, ist allein morphologisch nicht zu entscheiden. Das hat verschiedene Gründe: Einmal liegen die Prokollagen-Moleküle mit einem Durchmesser von $12 \text{ \AA}$ an der Grenze des Auflösungsvermögens, besonders im Schnitt. Dann gelingt eine "Anfärbung" der PG z.B. mit Rutheniumrot innerhalb der Zelle nur sehr schlecht, da das Eindringen durch die Membranen sehr stark behindert wird (SCOTT, 1975; GREILING, 1974; BALAZS, 1970; MERKER and STRUWE, 19 ; ROSS, 1975, 1968; BUBLITZ, 1975, hier auch weitere Literatur, TSIGANOS et al., 1971).

Ad 2.: Die Aggregation der aus dem Prokollagen durch Abspaltung der nicht-helikalen Endpeptide entstehenden Tropokollagenmoleküle erfolgt in hochgeordneter Form jeweils $1/4$ versetzt. Diese strenge Ordnung drückt sich im elektronenmikroskopischen Bild in der sehr exakten Querstreifung der kollagenen Fibrillen aus. Unklar ist bisher der Mechanismus, der diese Ordnung prägt. Biochemische Versuche mit löslichen Kollagen im Reagenzglas sprechen für eine Beteiligung der

sulfatierten Proteoglykane an diesem Vorgang (MERKER et al., 1977; NEMETH-CSOKA, 1970; MERKER and GÜNTHER, 1972; TOOLE and LOWTHER, 1968; TOOLE, 1976).

Die Sulfatgruppen der PG sind in der Lage, mit bestimmten Stellen des Tropokollagenmoleküls eine Bindung herzustellen. Die dreidimensionale Stellung der Polysaccharidketten im Raum entlang des zentralen, verbindenden Proteinfadens könnten durch das Einfangen der Tropokollagenmoleküle diesen Aggregationsprozess regulieren und steuern. Tatsächlich kann mit dem Elektronenmikroskop eine regelmäßige räumliche Beziehung der Proteoglykane zu den kollagenen Strukturen nachgewiesen werden. Hier muß allerdings eine methodenkritische Bemerkung eingefügt werden. Der Nachweis der Proteoglykane gelingt von positiv geladenen elektronendichten Substanzen mit dem negativ geladenen PG (Literatur siehe MERKER and GÜNTHER, 1972).

Als praktisch effektiv hat sich dabei das Rutheniumrot erwiesen. Negativ geladene Moleküle kommen aber in großen Mengen im Gewebe vor. Es besteht also keine Färbespezifität. Im mesenchymalen Interzellularraum stehen aber für die Anfärbung nur die Proteoglykane und die Glykosaminoglykane zur Verfügung. Die Anwendung dieser Technik ist hier also gerechtfertigt. Bei der Absättigung der negativ geladenen Gruppen z.B. durch Rutheniumrot mit beiden anderen Präparationsschnitten kommt es darüberhinaus zu

einem Zusammenbruch der entfalteten, dreidimensionalen Ausdehnung der PG-Makromoleküle. Sie schrumpfen zu granulären Gebilden und nur vereinzelt ist ihre Ausdehnung an den ausstrahlenden feinen Filamenten noch zu vermuten (MERKER, 1974).

Solche Granula sitzen nun in regelmäßigen Abständen ($700 - 800 \text{ \AA}$) den kollagenen Strukturen (Filamenten, Fibrillen) direkt oder über feine Faden verknüpft auf. Die Ordnung wird allerdings etwas markiert. In manchen Bildern hat man nämlich den Eindruck, daß die PG-Granula schraubenförmig um die Fibrille herum lokalisiert sind. Durch die geringe Schnittdicke können dadurch die PG-Granula, die unterhalb oder oberhalb der dargestellten Fibrille lokalisiert sind, abgetrennt werden. Es kommen also dann nur die PG-Granula zur Darstellung, die neben den Fibrillen im Schnitt liegen. Genaue Auswertungen von Bildern aus anderen Bindegewebsregionen und Serienschnitten machen aber eine regelmäßige Verknüpfung der PG mit den kollagenen Fibrillen wahrscheinlich (MERKER, unveröffentlichte Untersuchungen). Diese geordnete räumliche Beziehung zwischen beiden Strukturen läßt die oben referierte Vorstellung von der Beteiligung der sulfatierten PG an der Aggregation des Kollagens gerechtfertigt erscheinen. Auffällig ist auch das häufige Fehlen von PG-Granula an den kleinsten, noch gerade nachweisbaren

kollagenen Filamenten. Da sie an einzelnen Stellen darstellbar sind, könnte es sich hier um einen Artefakt handeln. Die PG sind in wässrigen Medien, wie Puffer, Fixierungsmittel und Acetonreihe offenbar leicht löslich. Eine quantitative Darstellung dieser Strukturen ist deshalb wenig sinnvoll. Es kann vermutet werden, daß die Bindung der PG-Granula an die kollagenen Filamente nicht so fest ist wie an die bereits voll aggregierten Fibrillen. Eine bevorzugte Lösung während der Präparation von den dünnen Filamenten wäre also durchaus denkbar (MERKER, 1975).

Aus unseren Befunden am Mesenchym der Gingiva-Anlage kann deshalb geschlossen werden, daß auch dieses Gewebe die Interaktion von Kollagen und PG nutzt, um die Aggregation der hier synthetisierten und sezernierten kollagenen Vorstufen durchzuführen. Die erhaltenen Befunde können als Grundlage für die Beurteilung des ausgereiften Bindegewebes von Mensch und Tier dienen. Zweifelloß spielen sich gerade an der Interzellulärsubstanz der Gingiva wesentliche Schritte der Parodontose und anderer entzündlicher Vorgänge ab. Die Beurteilung der Kollagen- und PG-Veränderungen auf der Grundlage der Kenntnis der normalen Verhältnisse wird durch die hier vorgelegten Befunde besser verständlich.

Ad 3.: Noch sehr unklar sind die Faktoren, die eine Parallelanordnung, also eine Bündelung der Einzelfibrillen bewirken. Als einzige Hypothese, die auf morphologischen Befunden beruht, bleibt auch hier die Beeinflussung der Kollagenaggregation durch PG. Diese zum Teil riesigen Makromoleküle bestehen aus einem zentralen verbindenden Strang, der aus Hyaluronsäure (im Knorpel) bzw. Glykoproteiden (in anderen Geweben) besteht. Von ihm aus strahlen Polypeptidfäden nach allen Richtungen aus. Ihnen sitzen unterschiedlich lange Ketten aus Disaccharideinheiten auf (GREILING, 1974; SCOTT, 1975; BALAZS, 1970; STOCKWELL, 1975).

Wenn die Sulfatgruppen der Disaccharidketten eine Rolle beim Einfangen der kollagenen Vorstufen und bei ihrer Aggregation spielen, ist ein richtender Einfluß der Nachbarketten auf parallel dazu aufwachsende Kollagenstrukturen durchaus denkbar. Damit ist aber gleichzeitig ein Mechanismus der Bündelung und Stabilisierung des Parallelverlaufes der Fibrillen gegeben. Die von einem zentralen, verbindenden Glied ausstrahlenden Untereinheiten könnten nach verschiedenen Richtungen die benachbarten Fibrillen verknüpfen. Dadurch ist eine zusätzliche Absicherung der Einzelfibrillen innerhalb des Bündels gegenüber einwirkenden mechanischen Kräften möglich. Das Bündel wird dadurch zu einer funktionellen Einheit.

Sehr offen ist auch noch die Frage der Kräfte, die die Bündel - oder Fasertextur, d.h. den Verlauf der Fasern prägen. Die Anordnung der Fasern im Raum ist wesentlich für die mechanische Belastbarkeit des jeweiligen Bindegewebsbezirkes. Gerade die Gingiva unterliegt den verschiedensten mechanischen Einwirkungen. Die Ausbildung einer nach allen drei Richtungen des Raumes verflochtenen Textur ist hier besonders sinnvoll. Dieses dreidimensionale Gitterwerk bildet sich schon relativ früh aus. Zu diesem Zeitpunkt - etwa Tag 15 oder 16 - ist aber eine wirksame mechanische Belastung wenig wahrscheinlich. Es ist deshalb berechtigt, eine genetische Determination dieses Texturtypes in der Gingiva zu vermuten. Allerdings müssen Umbaumöglichkeiten gegeben sein, da später bei Belastung durch Entwicklung der Zähne, Wachstumsprozesse im Gesichtsbereich und andere Belastungsveränderungen funktionsabhängige Wandlungen ablaufen.

Die genetische Prägung kann allerdings auch indirekt, also epigenetisch sein (MERKER, 1977). Dafür sprechen Überlegungen, die die Ursachen und Faktoren der Texturentstehung klären sollen. Die ersten Fibrillen und Fibrillenbündel entstehen in den Interzellularräumen des frühen Mesenchyms, die zunächst nur von einem Netzwerk der Proteoglykane ausgefüllt sind. Diese fädigen, verzweigten und untereinander verknüpften Makromoleküle werden nach außen durch

ihre Bindung an die Basalmembranen des Epithels, der Blutgefäße und später auch an das Unterkieferskelettgerüst stabilisiert. Veränderungen der Form und Wachstumsvorgänge des Unterkiefers erzeugen in diesem PG-Netzwerk Spannungsmuster, d.h. die PG ordnen sich entsprechend trajektorieller Spannungslinien an. Unterstellt man die Beteiligung der PG an der Aggregation des Kollagens und an der Bündelung der Fibrillen, so muß auch eine Prägung der Textur durch diese Substanzen angenommen werden (HACKELBERG, 1971; MERKER, 1974; TAUBE, 1976).

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, daß das Mesenchym der Gingiva-Anlage ein gutes Modell zum Studium der Entstehung und Reifung der Interzellulärsubstanz darstellt. Die hier ablaufenden morphologisch faßbaren Vorgänge entsprechen den bisher publizierten Befunden in anderen Mesenchymbezirken. Damit können die Ergebnisse der experimentellen Bindegewebforschung und die bisher erarbeiteten Vorstellungen über pathologische Veränderungen sowie therapeutische Beeinflussung des Bindegewebes weitgehend auf das gingivale Bindegewebe übertragen werden. Darüberhinaus konnten an diesem Modell neue biochemische Befunde über den intrazellulären Transport, den

Sekretionsmodus und die Beteiligung der PG an der Fibrillenaggregation strukturell untermauert werden.

5. Zusammenfassung

Bei Mäuse-Embryonen des Stammes NMRI von den Tagen 12 bis 19 wurde das Mesenchym der Gingiva elektronenmikroskopisch untersucht. Die Vorbereitung des Gewebes erfolgte sowohl in der üblichen Weise mit einer Glutaraldehyd-OsO₄-Doppelfixierung als auch mit der sogenannten Rutheniumrot-Methode zur Darstellung der Proteoglykane.

Nach diesen Befunden erfolgt der intrazelluläre Transport des Syntheseproduktes der Fibroblasten - Kollagen und Proteoglykane - über einen Vesikelfluß in den Golgi-Apparat. Die hier gefertigten Sekretgranula schützen ihren Inhalt sofort in den extrazellulären Raum aus. Die Fibroblasten gehören damit nicht zum Stapeltyp der sekretorisch aktiven Zellen wie die Drüsenzellen. Im extrazellulären Bereich läßt sich eine hochgeordnete räumliche Beziehung zwischen den kollagenen Strukturen und den Rutheniumrot-positiven PG-Granula darstellen. Auf dem Boden biochemischer Vorstellungen lassen diese Bilder eine Beteiligung der Proteoglykane an der geordneten Aggregation kollagener Vorstufen, an der Bündelung (Faserbildung) und an der Prägung der Verlaufsrichtung der Fasern (Textur) ver-

muten.

Damit stellt das Mesenchym bzw. Bindegewebe der Gingiva ein geeignetes Modell zum Studium dieser Vorgänge dar. Die Übereinstimmung der Verhältnisse hier mit den an anderen Bindegewebsregionen erhobenen Befunde erlauben eine Übertragung der dort erarbeiteten Resultate (experimentelle, pathologische, therapeutische Bindegewebsforschung) auch auf die Gingiva.

6. Literaturverzeichnis

- Amprino, R.: Upstake of S³⁵ in the differentiation and growth of cartilage and bone. In: Ciba foundation Symposium on bone structure and metabolism.
CHURCHILL, London, 1956, 89 - 102
- Amprino, R.: Autoradiographic research on the S³⁵ sulfate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth.
Acta Anat. 24, 121 - 128 (1955)
- Arnold, G.: Gewebemechanisches Verhalten des
and hyalinen Knorpels unter zyklischer
Hartung, C. Reformation.
Z. Anat. Entwicklungsgesch. 144,
303 - 311 (1974)
- Balazs, E.A.: Chemistry and molecular Biology of
intercellular matrix.
Academic Press, London - New York,
I - III, 1970
- Bublitz, G.: Morphologische und biochemische
Untersuchungen über das Verhalten
des Bindegewebes bei der strahlen-
bedingten Lungenfibrose.
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1973

- Carlson, E.C.,:
Upson, R.H.
and
Evans, D.K.
The production of extracellular
connective tissue fibrils by
chick notochordal epithelium
in vitro.
Anat. Rec. 179, 361 - 374 (1974)
- Ehrlich, H.P.:
and
Bornstein, P.
Microtubules in transcellular
movement of procollagen.
Nature (New Biol.) 238, 257 - 260
(1972)
- Ehrlich, H.P.:
Ross, R.
and
Bornstein, P.
Effect of antimicrotubular
agents on the secretion of
collagen.
J. Cell. Biol. 62, 390 - 405
(1974)
- Fernandez-Madrid, F.:
Collagen Biosynthesis: A review
Clin. Orthop. rel. Res. 68,
163 - 170 (1970)
- Fernando, N.V.P.:
and
Movat, H.Z.
Fibrillogenesis in regenerating
tendon.
Lab. Invest. 12, 214 - 221
(1963)
- Goel, S.C.:
and
Jacob, J.
Reinterpretation of the ultra-
structure of cartilage matrix.
Experientia 32, 216 - 217 (1976)

- Gould, B.S.: Collagen biosynthesis at the ribosomal level. In: Internat. Rev. Conn. tiss. Res. 4, 35 - 67 (1968)
- Grant, M.E.: Biosynthesis of collagen.
and New. Engl. J. Med. 286
Prockop, D.J. 291 - 297 (1972)
- Greiling, H.: Struktur und Stoffwechsel von Biopolymeren des Bindegewebes als Grundlage der Biomechanik von Bindegewebssystemen. In: Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritidis. Byk-Gulden, Konstanz, 25 - 39 (1974)
- Gross, J.: The behaviour of collagen units as a model in morphogenesis. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2 (Suppl), 261 - 274 (1956)
- Hackelberg, H.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung der Corneastromas bei der Ratte. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 1976

- Hardingham, T.H.,:
Fitton-Jackson, S.
and
Muir, H.
Replacement of Proteoglycans
in embryonic chick cartilage
in organ culture after treat-
ment with testicular hyaluronidase.
Biochem. J. 129, 101 - 109 (1972)
- Harwood, R.,:
Bhalla, A.K.,
Grant, M.E.
and
Jackson, D.S.
Synthesis and sekretion of
cartilage procollagen.
Biochem. J. 148, 129 - 138
(1975)
- Harwood, R.,:
Grant, M.E.
and
Jackson, D.S.
The route of secretion of
procollagen.
Biochem. J. 156, 81 - 90
(1976)
- Hay, E.D.:
and
Meier, S.
Glycosaminoglycan-synthesis by
embryonic inductors: neural
tube, notochord and lens.
J. Cell Biol. 62, 889 - 898
(1974)
- Horwitz, A.L.:
and
Dorfman, A.
Subcellular sites for synthesis
of chondronuoprotein of carti-
lage.
J. Cell Biol. 38, 358 - 368
(1968)
- Jansen, H.W.:
and
Bornstein, P.
Effects of antimicrotubular
agents on GAG synthesis and
secretion by embryonic chick
cartilage and chondrocytes.
Biochem.Biophys. Acta. 362
150 - 159 (1974)

- Kivirikko, K.I.:
and
Ristelli, L.
Biosynthesis of collagen and
its alterations in pathological
states.
Med. Biol. 54, 159 - 186 (1976)
- Koburg, E.:
Autoradiographische Untersuchun-
gen zum Eiweiß-Stoffwechsel der
Zellen des Knorpels und des
Knochens.
Beitr. pathol. Anat. allg. Path.
124, 108 - 119 (1961)
- Kruse, N.J.:
and
Bornstein, P.
The metabolic requirements for
transcellular movement and
secretion of collagen.
J. Biol. Chem. 250, 4841 - 4847
(1975)
- Kühn, K.:
and
Fitzek, P.P.
The structure of collagen. In:
Collagen metabolism in the liver
(ed. by H. Popper and K. Becker)
Stratton, New York, 1975, 15 - 28
- Kühn, K.,:
Grassmann, W.
and
Hofmann, U.
Über den Aufbau der Kollagen-
fibrille am Tropokollagenmole-
külen.
Naturwissenschaften 47, 258 - 259
(1960)
- Kudo, N.:
Effect of cholchine on the secretion
of matrices of dentine and manuel
in rat incisor.
Calcif. Tiss. Res. 18, 37 - 46
(1975)

- Lane, J.M.:
and
Weiss, C.
Current comment: Review of articular cartilage collagen research. Arthritis and Rheumat. 18
553 - 559 (1975)
- Levene, C.L.:
and
Bates, C.J.
Ascorbic acid and collagen synthesis in cultured fibroblasts. Am. New York Acad. Sci. 258,
288 - 291 (1975)
- Lindner, J.:
Über die Synthese der organischen Interzellulärsubstanz im Knorpel und Knochen. Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 47,
150 - 163 (1963)
- Mancini, R.E.,:
Vilar, O.,
Stein, E.
and
Fiorini, H.
A histochemical and autoradiographic study of the participation of fibroblasts in the production of mucopolysaccharids in connective tissue. J. Cytochem. 9, 278 - 291 (1961)
- Maroudas, A.:
Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. Biorheology 12, 233 - 241 (1975)
- Maroudas, A.:
Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. Nature 260, 808 (1976)

- Merker, H.-J.: Significance of the limb bud culture system for investigations of teratogenic mechanism. In: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development. (ed. by NEUBERT and MERKER). Thieme-Verlag, Stuttgart, 161 - 199 (1975)
- Merker, H.-J.: Entstehung und Reifung des Bindegewebes und die pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge: In: Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthrititis. Byk-Gulden, Konstanz, 93 - 105 (1974)
- Merker, H.-J.: Some considerations on the problem of critical phase. In: Malformations (ed. by W. LENZ). Excerpta Med. Found., Amsterdam, 1977
- Merker, H.-J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese im menschlichen Granulationsgewebe. Langenberg's Arch. 297, 411 - 423 (1961)
- Merker, H.-J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. Z. Zellforsch. 53, 411 - 430 (1961)

- Merker, H.-J.: Die elektronenmikroskopische
and Darstellung von GAG im Gewe-
Günther, Th. be mit Ruhteniumrot.
Histochemie 34, 293 -
(1973)
- Merker, H.-J.: "Das Knorpelgewebe" und "Das
Knochengewebe". In: Lehrbuch
der Anatomie (Hrg. von FERNER
und STAUBESAND).
Urban & Schwarzenberg, neue
Auflage, 1977
- Merker, H.-J.: Elektronenmikroskopische Unter-
and suchungen zum Problem der Se-
Struwe, K. kretion der bindegewebigen In-
terzellulärsubstanz.
Z. Zellforsch. 115, 212 - 225
(1971)
- Merker, H.-J.,: Effect of SP 54 on the collagen
Toepfer, Kh. of embryonic limb buds cultured
and in vitro.
Günther, Th. Experientia 33, 657 - 658 (1977)
- Meyers, S.: Stimulation of carneal diffe-
and rentiation by interaction between
Hay, E.D. cell surface and extracellular
matrix.
J. Cell Biol. 66, 275 - 291
(1975)

- Miller, E.J.: Biosynthesis of collagen.
and Fed. Proc. 33, 1197 - 1204
Matukas, V.J. (1974)
- Muller, P.K.: Collagen biosynthesis as an
and example for the regulation
Kühn, K. of gene expression in mes-
enchymal cells.
Arzneimittelforschung 27,
199 - 207 (1977)
- Nemeth-Csoka, M.: Importance of sulphated acid
muco-polysaccharides for fibrillo-
genesis in carracenin granulomata
of rats at different ages.
Exp. Geront. 5, 67 - 75 (1970)
- Orlowski, W.A.: The incorporation of H^3 -prolin
into the collagen of the
periodontium of the rat.
J. periodont. Res. 11,
96 - 103 (1976)
- Parry, D.A.: Quantitativ electron microscope
and observations of the collagen
Craig, A.S. fibrils in rat-tail tendon.
Biopolymers. 16, 1015 - 1031
(1977)
- Prockop, D.J.: The intracellular biosynthesis
of collagen.
Arch. Int. Med. 124, 563 - 569
(1969)

- Rich, A.: The structure of collagen.
and Nature 176, 915 - 916
Crick, F.H. (1955)
- Rohr, H.P.: Beitrag zur Bildung binde-
and gewebiger Matrix in glatten
Jurukova, Z. Muskelzellen. Elektronenmi-
kroskopische-autoradiogra-
phische Untersuchungen mit
 H^3 -Prolin und S^{35} -Sulfat am
Oestrogen-stimulierten Mäuse-
uterus.
Pathol. Europ. 3, 571 - 579
(1968)
- Rohr, H.: Die Kollagensynthese in ihrer
Beziehung zur submikroskopi-
schen Struktur der Osteoblasten.
Virchow's Arch. 338, 342 - 354
(1965)
- Rojkind, M.: The effect of colchicine on
and collagen, albumine and trans-
Kershenobich, D. ferrin synthesis by cirrhotic
rat liver slices.
Biochem. Biophys. Acta 378,
415 - 423 (1975)

- Ross, R.: Connective tissue cells, cellproliferation and synthesis of extracellular matrix. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 271, 247 - 260 (1975)
- Ross, R.: Wound healing and collagen
and formation V. Quantitative
Benditt, E.P. electron microscopical radio-
autographic observations of
prolin- H^3 intilisation by
fibroblasts.
J. Cell Biol. 27, 83 - 106
(1965)
- Ross, R.: Wound healing and collagen
and formation II.
Benditt, E.P. J. Cell Biol. 15, 99 - 108
(1962)
- Ross, R.: Connective tissue forming cells.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 34,
33 - 37 (1974)
- Ross, R.: The connective tissue fibre
forming cell. In: Treatise on
collagen (ed. B.S. GOULD).
Academic Press, New York, 1968
1 - 12
- Scott, J.E.: Physiological function and
chemical composition of peri-
cellular proteoglycan.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.
271, 235 - 242 (1975)

- Scherft, J.P.: Accumulation of collagen-containing vacuoles in osteoblasts after administration of colchicine.
and Heersche, J.N.M. Cell Tiss. Res. 157, 353 - 365 (1975)
- Schindler, F.H.,: Synthesis of cartilage collagen
Ose, M.A. by rabbit and human chondrocytes
and in primary cell cultures.
Solush, H. In vitro 12, 44 - 49 (1976)
- Schmitt, F.O.: The macromolecular basis of collagen structure. In: Connective tissue, Thrombosis and atherosclerosis (ed. by PAGE).
Academic Press, New York-London, 43 - 66 (1959)
- Schwarz, W.: Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes. In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes (Hrsg. HAUSS und LOSSE).
Thieme Verlag, Stuttgart, 1960, 106 - 129
- Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sehnenfibrillen verschiedener Wirbeltiere.
Z. Zellforsch. 48, 309 - 323 (1958)

- Schwarz, W.,: Wachstum und Altern des Bindegewebes.
Merker, H.-J.,
Jahnke, A. Berl. Med. (Festschrift 10 Jahre TU), 88 - 93 (1958)
and
Hoffmann, M.
- Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau und die Bildung der Sehne.
Verh. Dtsch. Ges. Orthop. 48,
38 - 44 (1961)
- Schwarz, W.: "Das Bindegewebe". In: Lehrbuch der Anatomie (Hrsg. von FERNER und STAUBESAND).
Urban & Schwarzenberg, München, neue Auflage, 1977
- Schwarz, W.: Fibrillogenese und Bildung der elastischen Fasern.
Arch. Biol. (Liege) 75,
369 - 396 (1964)
- Steven, F.S.: Maturation of the collagen fibrils.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 34,
36 - 45 (1974)
- Stockwell, R.A. Structural and histochemical aspects of the percellular environment in cartilage.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 271, 243 - 246 (1975)

- Taube, K.J.: Die Entwicklung kollagener Texturmuster im Corium der embryonalen und neugeborenen Maus. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 1976
- Toole, B.P.: Biochem J. 109, 857 - 862 (1968)
and
Lowther, D.A.
- Toole, B.P.: J. Biol. Chem. 251, 895 - 899 (1976)
- Trelstad, R.L.: Vacuoles in the embryonic chick corneal epithelium, an epithelium which produces collagen. J. Cell Biol. 48, 689 - 694 (1971)
- Tsiganos, C.P.,
Hardingham, T.E.
and
Muir, H. Proteoglycans of cartilage: An assessment of their structure. Biochem. Biophys. Acta. 229, 529 - 537 (1971)
- Weinstock, M.: Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by autoradiography after H^3 -prolin administration. J. Cell Biol. 60, 92 - 127 (1974)
and
Leblond, C.P.

Weinstock, M.

Collagen formation - observations
on its intracellular packing
and transport.

Z. Zellforsch. 129, 455 - 467
(1972)

Weiss, P.:

Erzwingung elementarer Struktur-
verschiedenheiten an in vitro-
wachsenden Geweben.

Roux' Arch. 116, 438 - 554
(1929)

BILDANHANG

Abb. 1: Mäuse-Embryo, Tag 12, Unterkieferbereich mit bedeckender Epithelschicht (E) aus einer kubischen basalen und einer oberflächlichen flachen Lage (Periderm) und dem subepithelialen Mesenchym. Unregelmäßig geformte Mesenchymzellen (M) und unterschiedlich weite Interzellularräume (I). Basalmembran deutlich ausgebildet.

Vergrößerung: 1 : 10 000

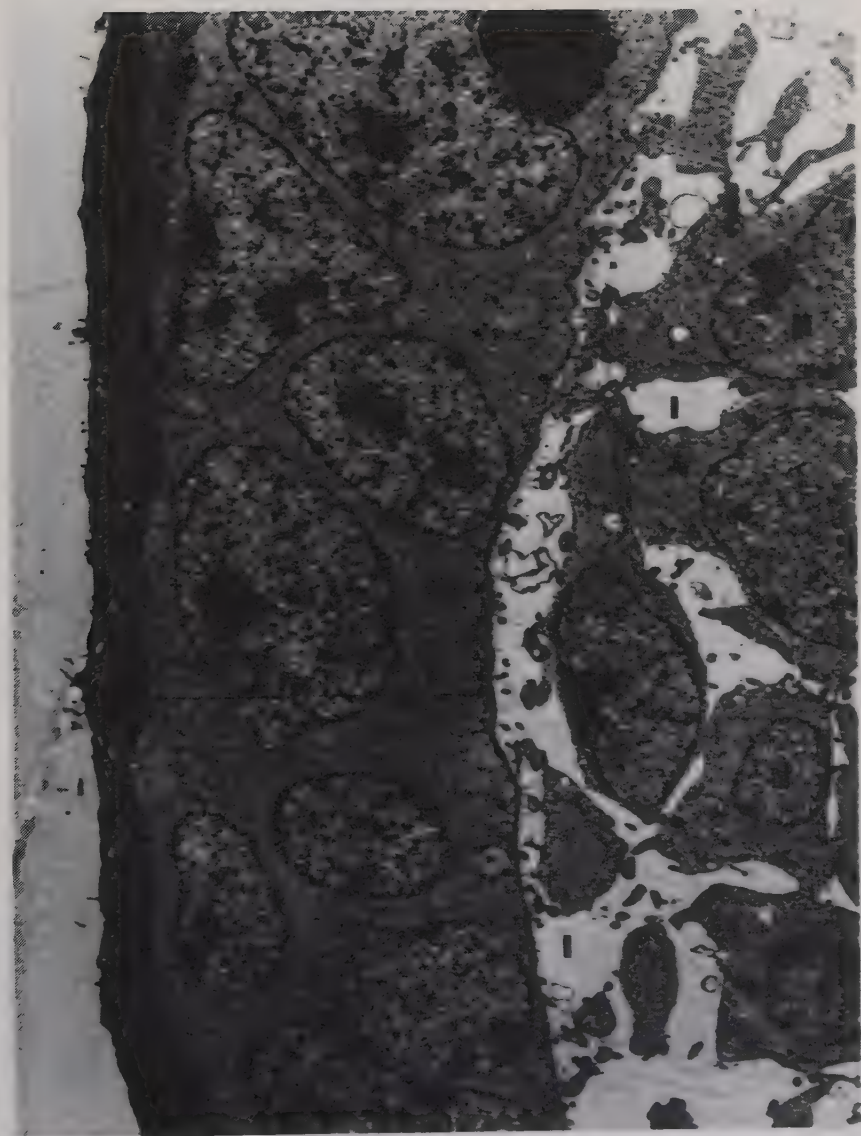


Abb. 2: Mäuse-Embryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.
Interzellularraum zwischen Mesenchym-
zellen (M) und Mesenchymzellfortsätzen
(F) mit elektronendichten (rutheniumrot-
positiven) Granula, von denen feine
Filamente ausstrahlen (+). Erste Aggre-
gation filamentärer Kollagenvorstufen
zu Fadenstrukturen bzw. Fibrillen mit
teilweise regelmäßig aufsitzenden Gra-
nula (►).

Vergrößerung: 1 : 70 000

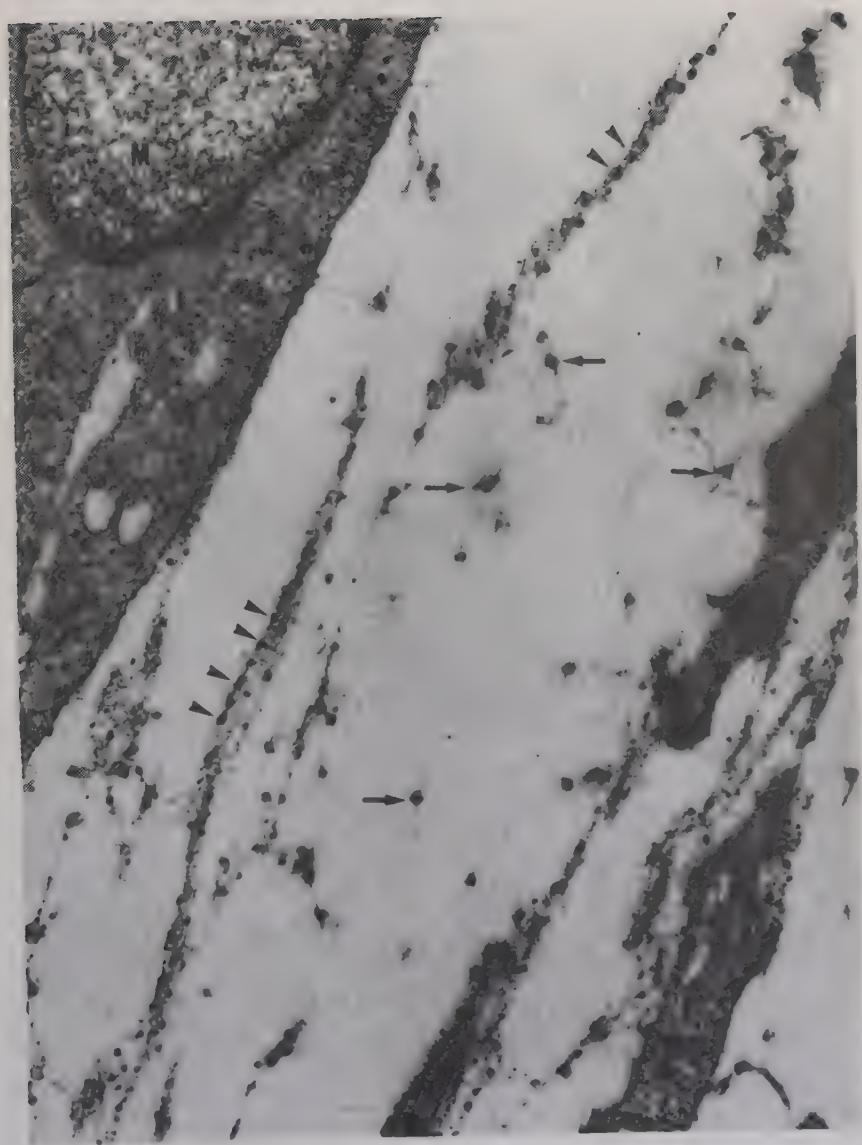


Abb. 3: Mäuse-Embryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.
Interzellularraum des Mesenchyms mit
feinen kollagenen Filamenten (←) und
wenigen, gebündelten Kollagenfibrillen
mit aufsitzenden Rutheniumrot-positiven
Granula (►). Mesenchymzellfortsatz (F).

Vergrößerung 1 : 110 000

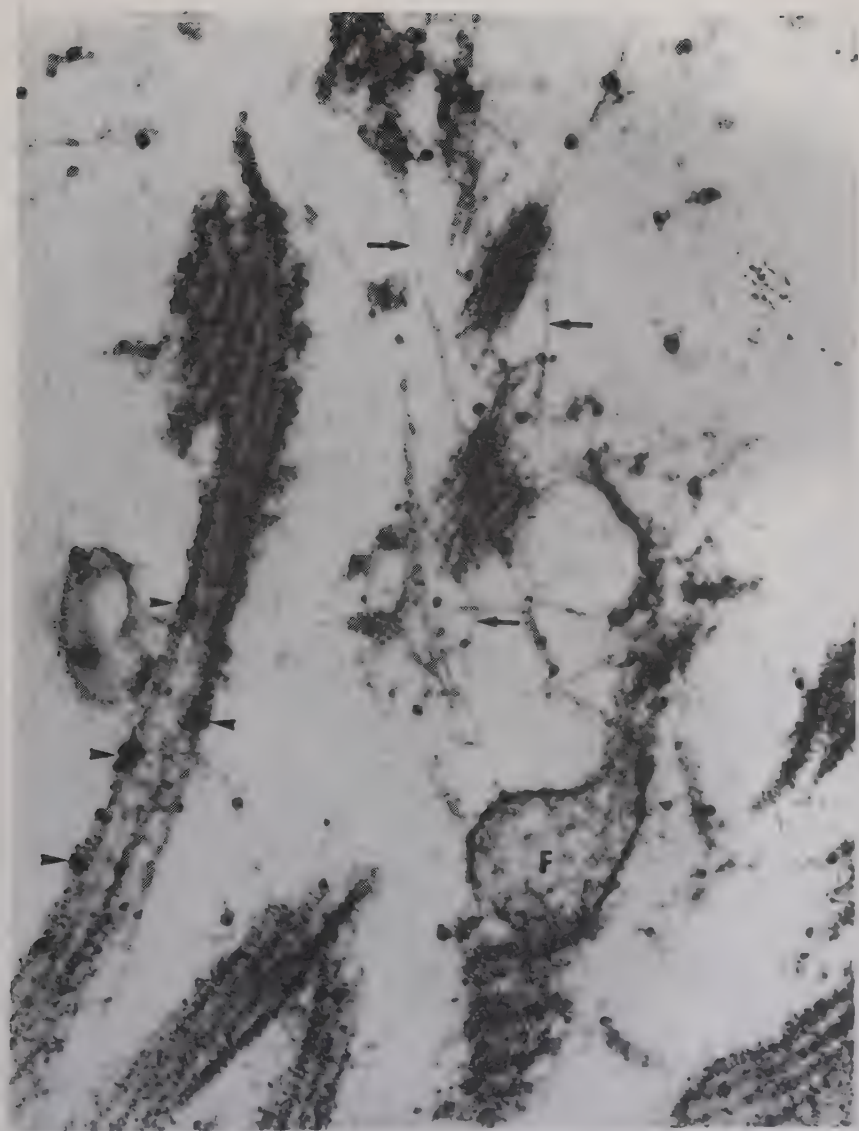


Abb. 4: Mäuse-Embryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.

Interzellularraum zwischen Mesenchym-
zellfortsätzen (F) mit Filamenten,
denen Rutheniumrot-positive Granula
(+) aufsitzen. Bei ► ein Bündel von
Fibrillen.

Vergrößerung: 1 : 90 000

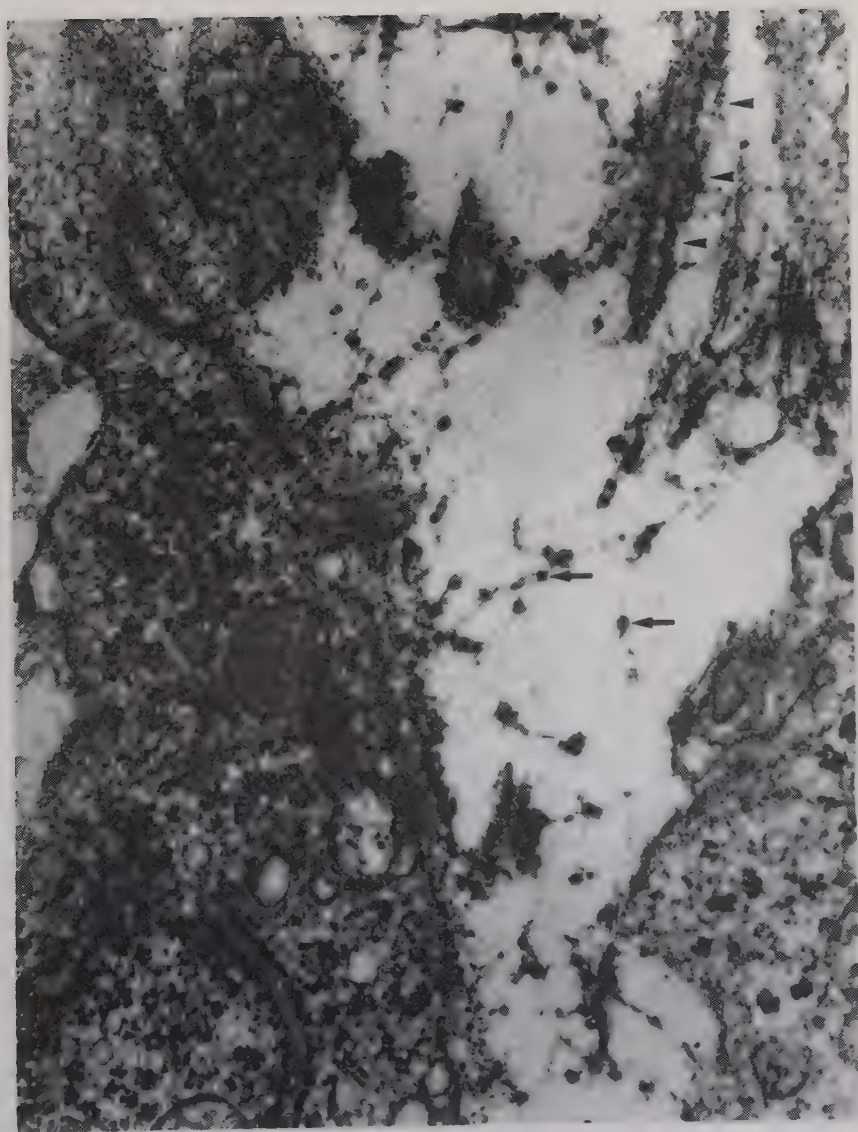


Abb. 5: Mäuse-Embryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.
Interzellularraum des Mesenchyms mit
Kollagenfibrillen, denen andeutungs-
weise geordnet Rutheniumrot-positive
Granula aufsitzen (+), Bündel von Fi-
lamenten im Schrägschnitt (x) und freie
PG-Granula (►).

Vergrößerung: 1 : 110 000

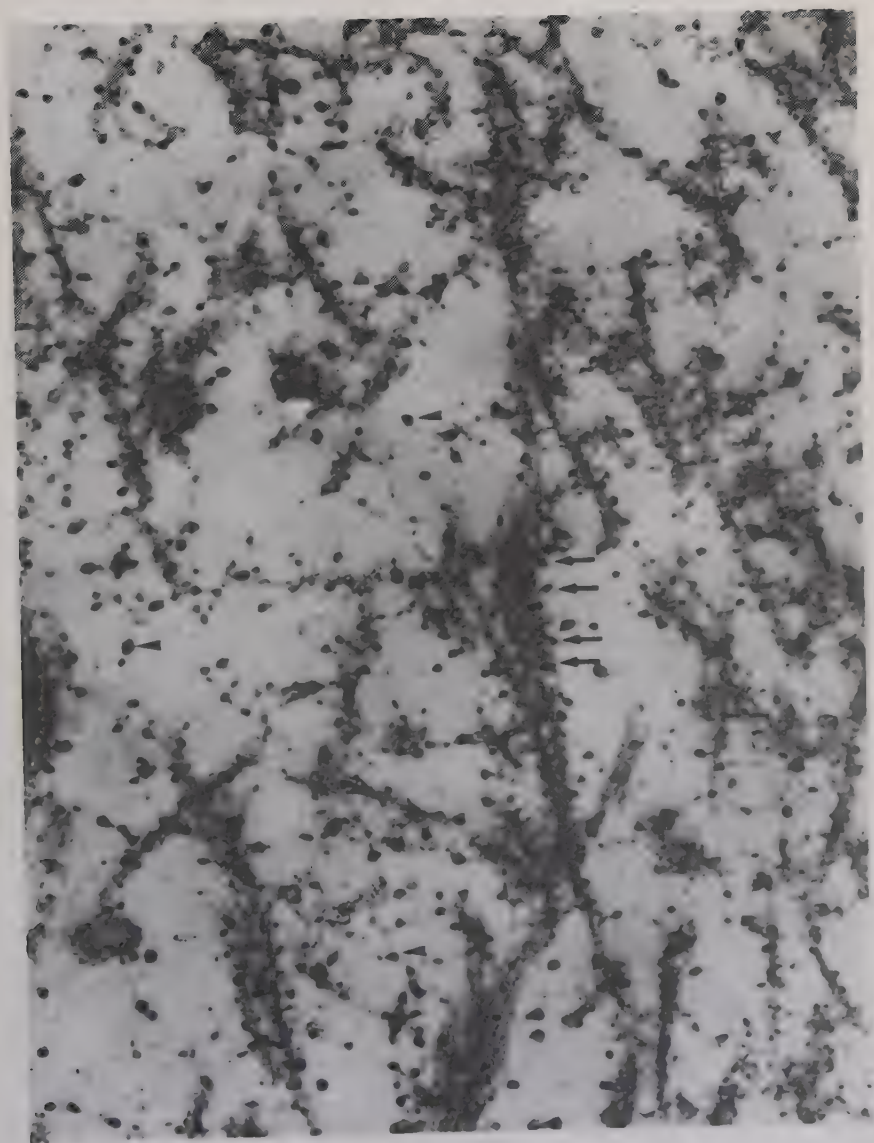


Abb. 6: Mäuse-Embryo, Tag 14. Gingiva-Anlage.
Interzellularraum des Mesenchyms. Zahl
reiche freie (+) oder den kollagenen
Strukturen aufsitzende Rutheniumrot-
positive PG-Granula (►).

Vergrößerung: 1 : 150 000

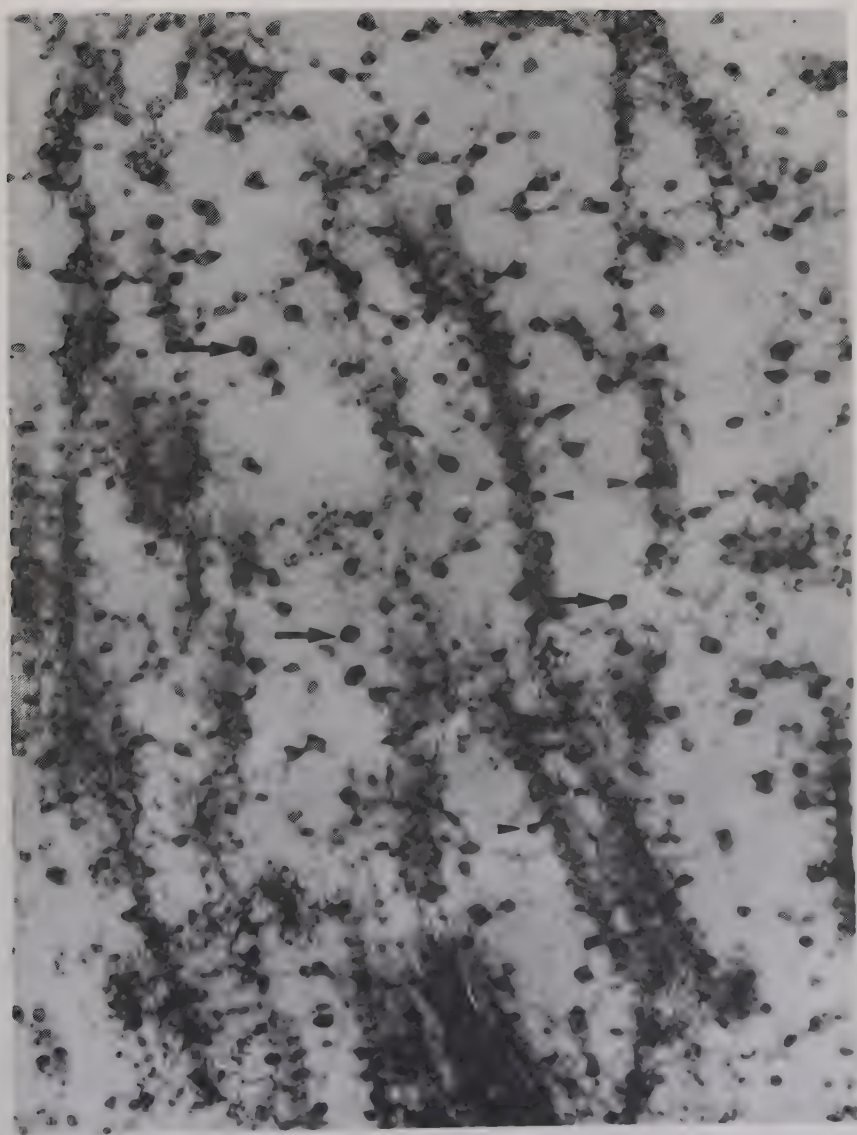


Abb. 7: Rattenembryo, Tag 16. Gingiva-Anlage.
Tangential angeschnittene Mesenchym-
zelle (M). Rutheniumrot-positive PG-
Granula in regelmäßigen Abständen den
Kollagenfibrillen aufsitzend (+). Da-
neben freie PG-Granula (o) und einzeln
(►) oder gebündelt verlaufende filamen-
täre Vorstufen des Kollagens.

Vergrößerung: 1 : 110 000

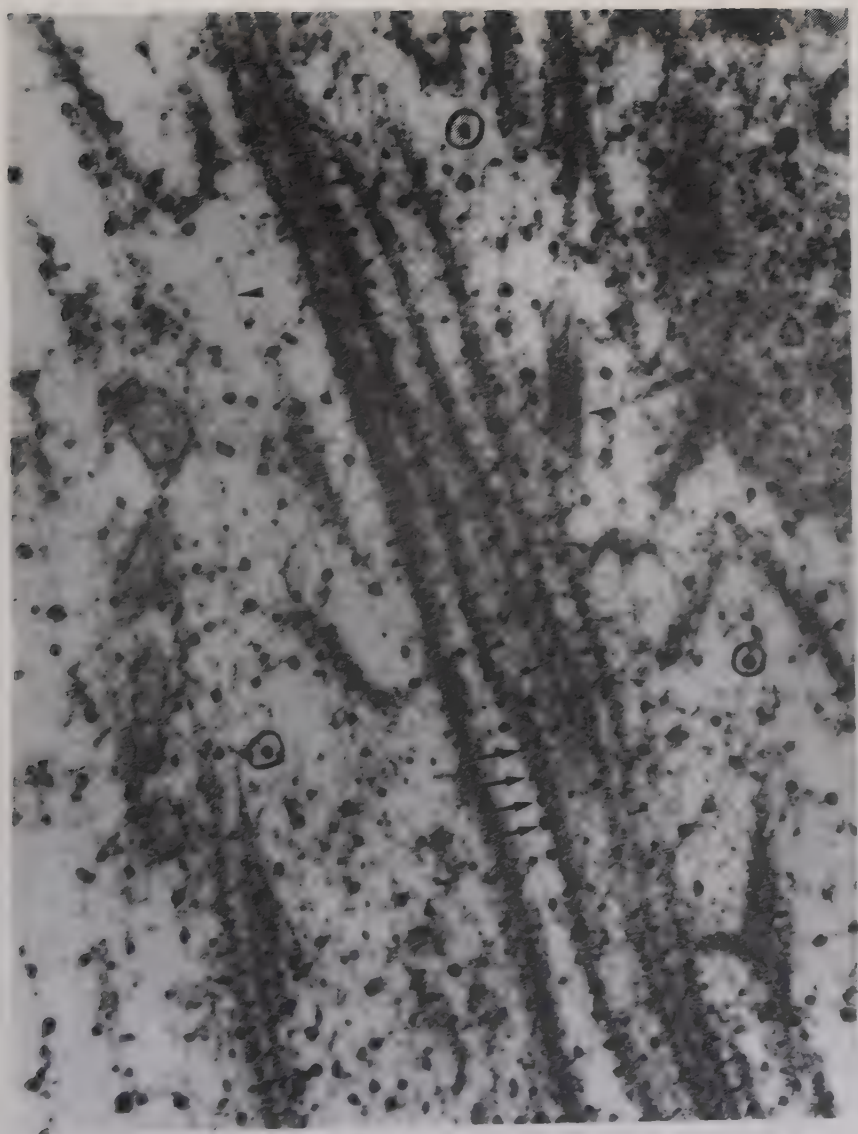


Abb. 8: Rattenembryo, Tag 17. Gingiva-Anlage.
Teil einer Mesenchymzelle mit Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (x) und Mitochondrien (M). Im extrazellulären Raum quergeschnittene Bündel von kollagenen Fibrillen, die durch ein feinfilamentäres Material verknüpft sind (+). Bei * dichtes, feingranuläres Material (Vorstufen elastischer Fasern?).

Vergrößerung: 1 : 45 000

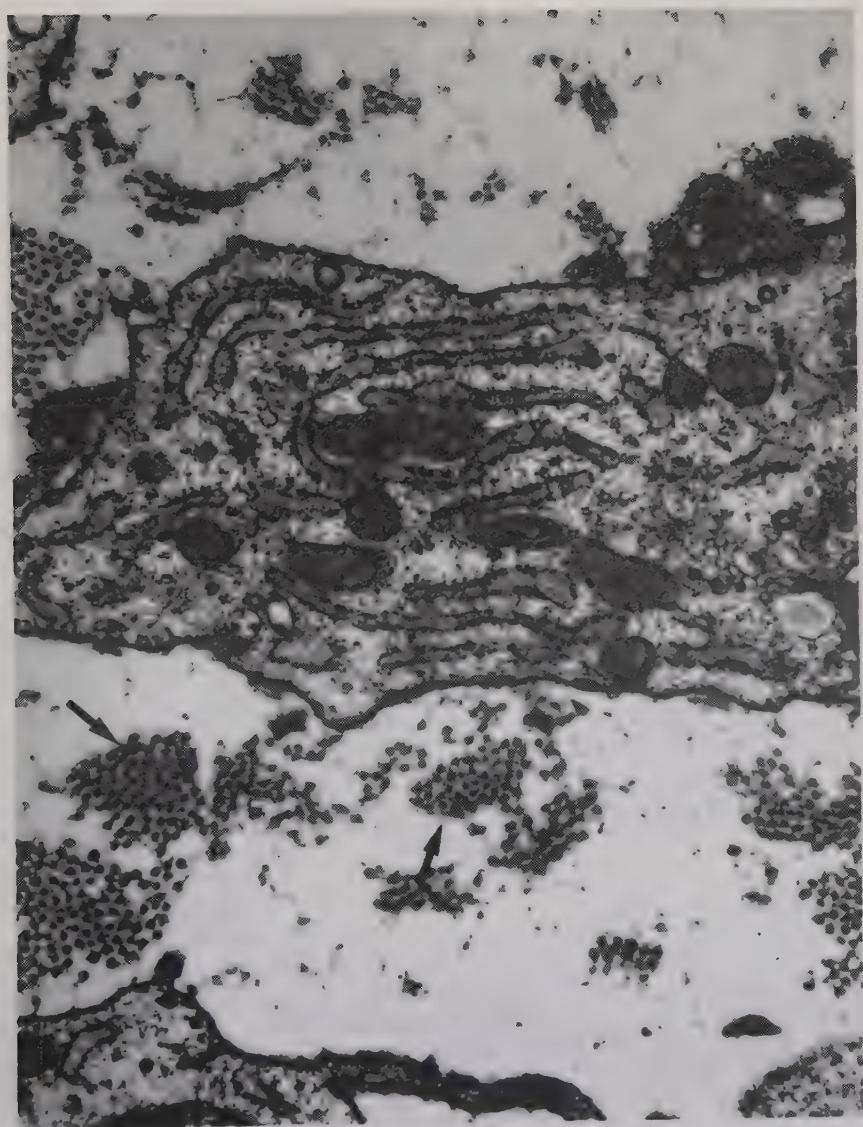


Abb. 9: Neugeborene Maus. Gingiva. Große kollagene Fibrillenbündel im Quer- (1) und Schrägschnitt (2). Zusammen mit einer kleinen quergeschnittenen elastischen Faser (x) neben einem Fibroblasten (F) mit etwas erweiterten Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (✱).

Vergrößerung: 1 : 35 000

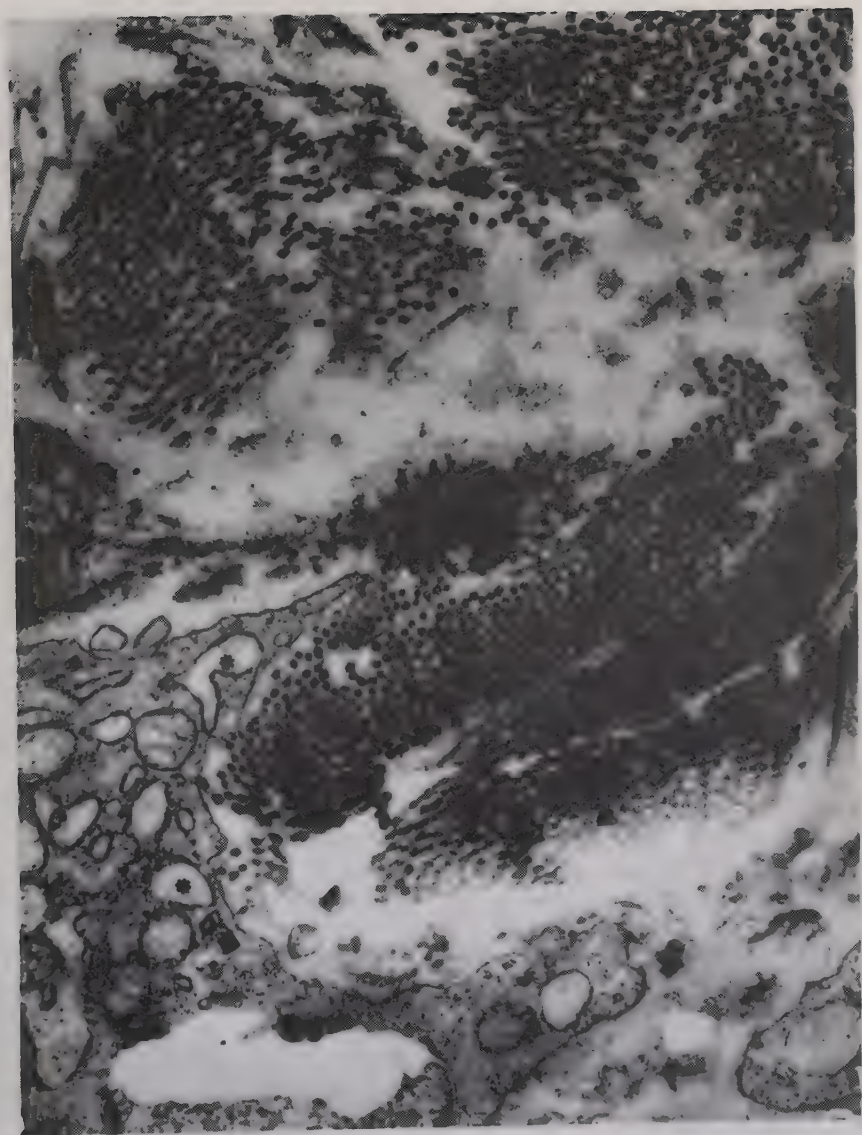


Abb. 10: Fibroblast mit gut gefüllten Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (*). Im extrazellulären Raum unterschiedlich große Bündel parallel verlaufender kollagener Fibrillen (+) mit aufsitzenden PG-Granula.

Vergrößerung 1 : 21 000



Abb. 11: Rattenembryo, Tag 17. Gingiva-Anlage.

Teil eines Fibroblasten mit Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (x), Mitochondrien (M), Nucleolus (No) und einzelnen Vakuolen bzw. elektronendichten Granula (+). Im extrazellulären Raum zumeist quergeschnittene kollagene Fibrillenbündel (K).

Vergrößerung: 1 : 35 000

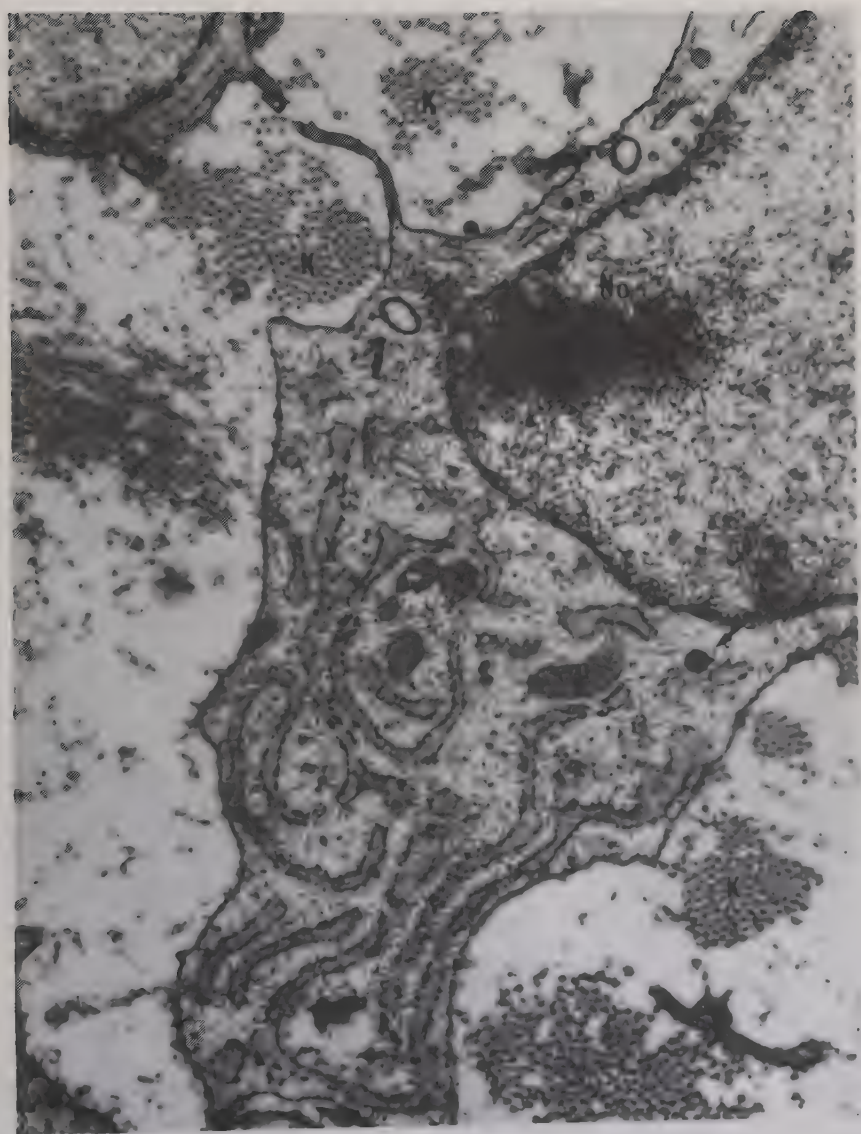


Abb. 12: Rattenembryo, Tag 12. Gingiva-Anlage.
Teil eines Fibroblasten mit cisternen-
artigen Erweiterungen der Hohlräume
des rauhen endoplasmatischen Retikulums
(x), die schlecht definierbares granu-
läres bis feinfilamentäres Material
enthalten.

Vergrößerung: 1 : 42 000

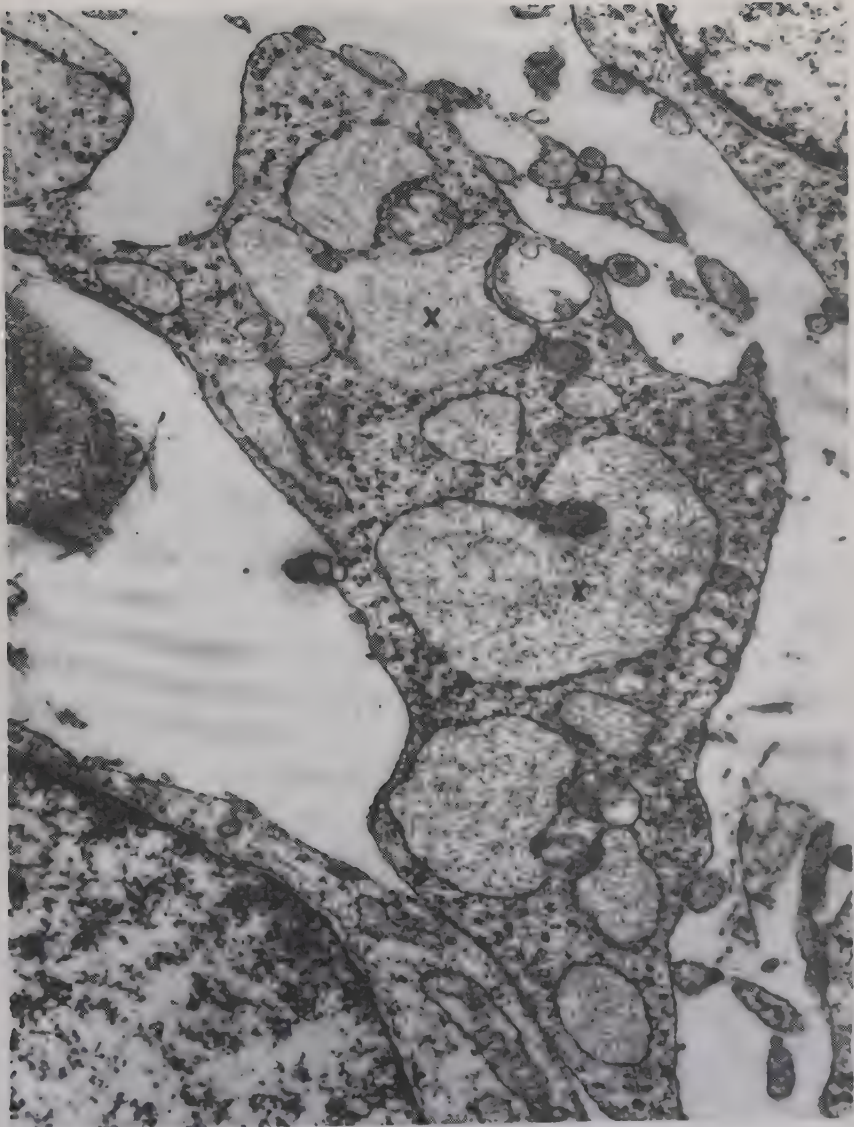


Abb. 13: Rattenembryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.

Teil eines Fibroblasten mit Hohlräumen
des rauhen endoplasmatischen Retikulums
(x), Golgi-Apparat (G), vesikularen
Strukturen (+) und drei dichte Sekret-
granula (►).

Vergrößerung: 1 : 110 000

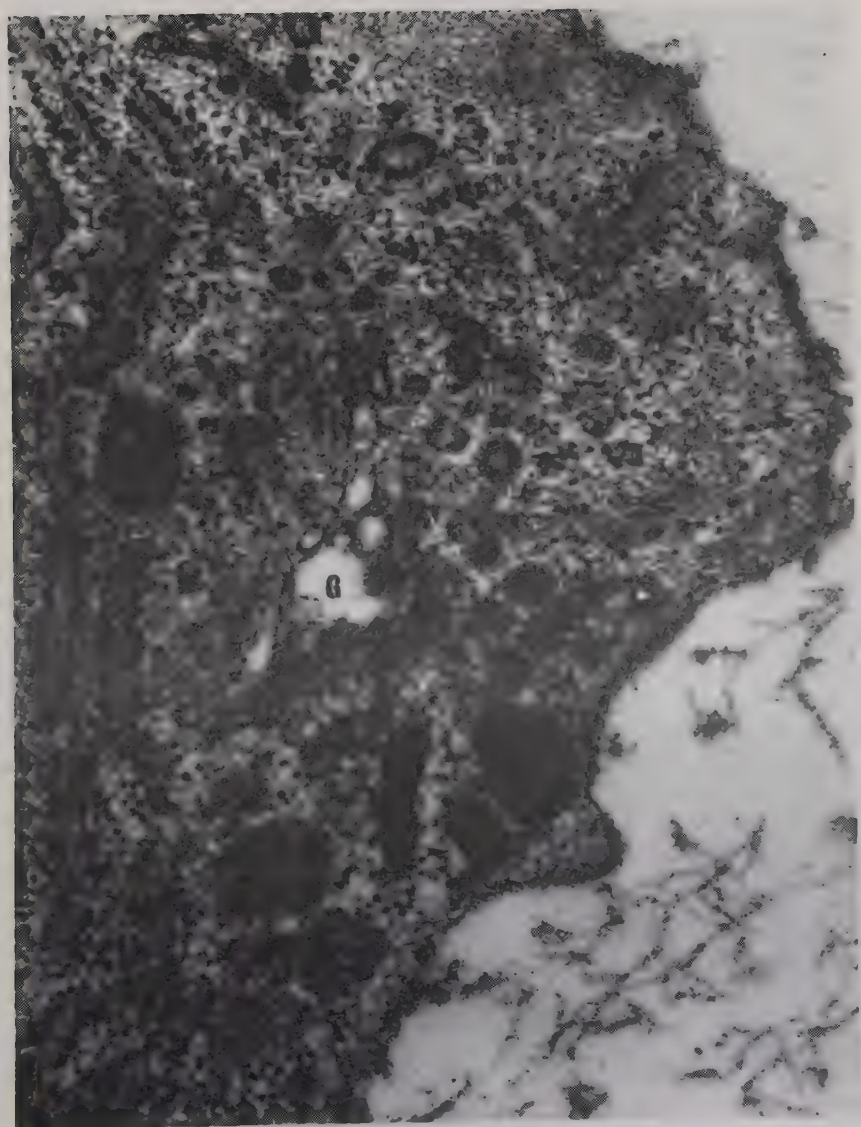
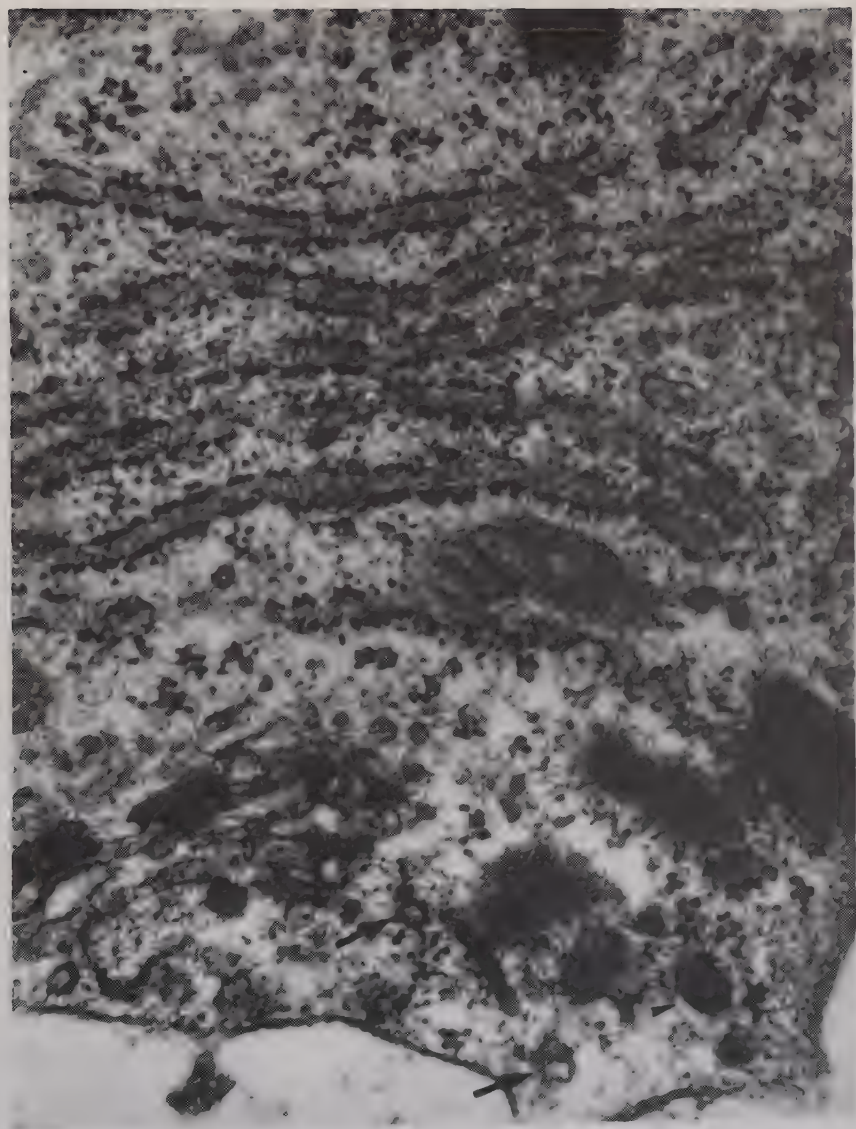


Abb. 14: Rattenembryo, Tag 13. Gingiva-Anlage.

Teil eines Fibroblasten mit Hohlräumen
des rauhen endoplasmatischen Retikulums
(x), Golgi-Apparat (G), vesikulären
Strukturen (+) und elektronendichten
"Sekretgranula" (►).

Vergrößerung : 1 : 110 000



Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Merker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern der WE Anatomie der Freien Universität Berlin, besonders den Damen Frl. U. Krüger und Frl. H. Stürje für die stets freundlich gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 20. April 1948 wurde ich als Sohn des Facharztes für Chirurgie Dr. Helmuth Hörstmann und seiner Ehefrau Ilsetraud in Celle/Niedersachsen geboren.

Die Grundschule besuchte ich am gleichen Ort von 1954 - 1960, wechselte dann in das Gymnasium Hermann Billung in Celle und bestand das Abitur im Mai 1967.

Ab Wintersemester 1967/68 studierte ich Tiermedizin an der Freien Universität Berlin und wechselte im Wintersemester 1968/69 zur Zahnmedizinischen Fakultät an der Freien Universität. Das Staatsexamen (mit Erteilung der Approbation) absolvierte ich im Juni 1976, ebenfalls an der Freien Universität.

Seit Juli 1976 arbeite ich in einer Privatpraxis hier in Berlin und werde ab November 1977 meine Ausbildung vor allem auf kieferchirurgischem Gebiet in Passau fortsetzen. Ende 1978 werde ich mich in meiner Heimatstadt Celle niederlassen.

